

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「精神・神経疾患の分子病態理解に
基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
研究課題「孤発性 ALS モデル動物作成を
通じた分子標的治療開発」

研究終了報告書

研究期間 平成20年10月～平成26年3月

研究代表者: 祖父江 元
(名古屋大学大学院医学系研究科・教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は発症から 3-5 年程度で致命的な経過をたどる極めて難治性の神経変性疾患であり、90%以上が孤発例である。これまで ALS の病態・治療研究は遺伝性 ALS の原因遺伝子を手がかりとして進められてきたが、孤発性 ALS の病態の大部分は不明で、治療開発は極めて難航してきた。こうした状況の最も重要な要因は、孤発性 ALS の病態を反映する動物モデルが得られていないことであり、そのため遺伝性 ALS の研究で得られた候補治療薬が孤発例に対して有効性が見出せない場合も多い。我々は本研究において、とくに dynactin 1, ADAR2, TDP-43 等の分子に注目し、孤発性 ALS 患者の変性運動ニューロンに見られる分子イベントを再現するモデル動物を開発し、細胞間ネットワークの異常を含めたニューロン変性の病態を解明し、病態を抑止する分子標的治療の開発を目指した。

Dynactin 1 については、孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおいて dynactin 1 の発現が病態の早期から低下していることに着目し、この病態を再現するモデルとして、運動ニューロン特異的 *dnc-1* (dynactin 1 の相同体) ノックダウン線虫を作成し、dynactin 1 の発現低下による運動ニューロン変性の分子メカニズムについて解析した。その結果、運動ニューロンにおける dynactin 1 の発現低下によりオートファゴソームの軸索輸送が障害され、孤発性 ALS 患者でみられるのと同様な運動ニューロン変性・軸索変性・運動機能障害が生じることを明らかにした。さらに、HDAC6 阻害剤である trichostatin A が、オートファゴソームの軸索輸送を促進することによって、dynactin 1 の発現低下による運動ニューロン変性を抑制することから、本剤が孤発性 ALS の治療候補であることを明らかにした (Ikenaka et al., *PLoS One* 2013: 祖父江グループ)。TDP-43 については、孤発性 ALS 患者の運動ニューロンにおいて TDP-43 が核外に脱出していることに着目し、TDP-43 の核における生理的機能の低下が運動ニューロン変性を誘導するとの仮説を立て、運動ニューロン特異的 TDP-43 ノックアウト (KO) マウスを作成した。その結果、出生後の TDP-43 の発現低下によりマウスの運動機能障害が惹起され、運動ニューロン変性や軸索変性・神経筋接合部の脱神経・筋萎縮など孤発性 ALS の病理像が再現されること、およびその病態にオートファジーの異常などが関与していることを明らかにした (Iguchi et al., *Brain* 2013: 祖父江グループ)。さらに、核における TDP-43 の機能障害の分子基盤として、TDP-43 がスプライソソーム構成因子 snRNP の構成に重要な SMN と複合体を形成していること、および TDP-43 を欠失した細胞では Gem が消失・減少することを明らかにした。また、TDP-43 の発現抑制によりスプライソソームの RNA 成分である snRNA (small nuclear RNA) の発現異常が起こることから、TDP-43 による RNA 代謝の障害が孤発性 ALS における運動ニューロン変性に寄与していると考えられた (Tsuiji et al. *EMBO Mol Med* 2013: 山中グループと祖父江グループの共同研究)。一方、孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおけるグルタミン酸受容体 (GluA2) の RNA 編集異常に注目し、RNA 編集酵素である ADAR2 の発現・活性が ALS 運動ニューロンにおいて低下していること、およびそれを再現する運動ニューロン特異的 ADAR2 KO マウス (AR2) の解析を行い、ADAR2 欠損によって未編集型 GluA2 の発現が増加することで運動ニューロン変性が直接誘導されること、および AAV ベクターを用いて外来性に ADAR2 を補充することで AR2 マウスにおける運動ニューロン変性が抑制されることが明らかになった (Hideyama et al. *J Neurosci* 2010; Yamashita et al., *EMBO Mol Med* in press: 郭グループ)。さらに、ADAR2 の発現低下が TDP-43 の断片化や細胞内局在の異常を誘導することも明らかとなった (Yamashita et al., *Nat Commun* 2013: 郭グループ)。

本研究では、3 つのグループが有機的に連携しつつ研究成果を挙げることにより、①孤発性 ALS の病態パスウェイにおいて、dynactin 1, ADAR2, TDP-43 の各々の分子の機能障害が単独で運動ニューロン変性を惹起しうること、②それらの病的変化の間には相互作用があり、複数の経路が総合的に神経変性に至ること、および③これらの分子が ALS の治療開発における分子標的となりうること、を明らかにした。今後、本研究の成果をさらに発展させることで、ALS に対する根本的治療法の開発が大きく前進することが期待される。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. TDP-43 の機能低下による孤発性 ALS 発症メカニズムの解明

概要: 孤発性 ALS のマウスモデルとして運動ニューロン特異的 TDP-43 ノックアウト (KO) マウスを作成し、出生後の TDP-43 の発現低下によりマウスの運動機能障害が惹起され、運動ニューロン変性や軸索変性・神経筋接合部の脱神経・筋萎縮など孤発性 ALS の病理像が再現されること、およびその病態にオートファジーの異常などが関与していることを世界で初めて明らかにした (Iguchi et al., *Brain* 2013)。

2. RNA 編集異常による運動ニューロン変性の分子機序の解明

概要: RNA 編集酵素である ADAR2 の発現低下による GluA2 の RNA 編集異常が孤発性 ALS に広く生じている疾患特異的分子異常であり、この分子病態を反映するコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) の解析から、ADAR2 欠損による未編集型 GluA2 の発現が運動ニューロン死の直接原因であることが明らかになった (Hideyama et al., *J Neurosci* 2010)。

3. TDP-43 の発現低下によるスプライソソームの機能異常の解明

概要: TDP-43 がスプライソソーム構成因子 snRNP の構成に重要な SMN と複合体を形成していること、および TDP-43 や FUS を欠失した細胞では Gem が消失・減少することを明らかにした。また、TDP-43 の発現抑制によりスプライソソームの RNA 成分である snRNA (small nuclear RNA) の発現異常が起こることを明らかにした (Tsuiji et al., *EMBO Mol Med* 2013)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 孤発性 ALS の線虫モデルの作成と治療法の開発

概要: 孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおける dynactin 1 の発現低下を再現するモデルとして、運動ニューロン特異的 dnc-1 (dynactin 1 の相同体) ノックダウン線虫を作成し、運動ニューロンにおける dynactin 1 の発現低下によりオートファゴソームの軸索輸送が障害され、運動ニューロン変性・運動機能障害が生じることを明らかにした。さらに、HDAC6 阻害剤である trichostatin A が dynactin 1 の発現低下による運動ニューロン変性を抑制することから、本剤が孤発性 ALS の治療候補であることが示された (Ikenaka et al., *PLoS One* 2013)。

2. c-Abl キナーゼを標的とした ALS の治療法開発

概要: 孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおいてチロシンキナーゼの一種である c-Abl の発現が亢進していることに基づき、ALS のマウスモデルに c-Abl 阻害剤 (dasatinib) を投与した。その結果、dasatinib が運動ニューロンにおける c-Abl の発現・リン酸化を抑制し、caspase の活性化を阻害することで運動ニューロン死を抑制することを明らかにした (Katsumata et al., *PLoS One* 2012)。

3. AAV-ADAR2 による孤発性 ALS マウスモデルへの治療介入効果

概要: ADAR2 の発現低下により TDP-43 の断片化が誘導されることから、ADAR2 が TDP-43 の異常を介して孤発性 ALS の病態に寄与していることが明らかとなった (Yamashita et al., *Nat Commun* 2013)。さらに、コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) に AAV ウイルスベクターを用いて ADAR2 を補充すると、運動ニューロンにおける ADAR2 の発現回復に伴って GluA2 の RNA 編集異常および TDP-43 の核局在が改善し、運動ニューロン変性が抑制されることを明らかにした (Yamashita et al., *EMBO Mol Med* 2013)。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「祖父江」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
祖父江 元	名古屋大学医学系研究科	教授	H20.10～
黄 哲	同上	研究員	H20.10～
藤内 玄規	同上	D 4	H20.11～
脇田 将嗣	同上	テクニカルスタッフ	H20.11～H21.3
佐々木 貴紀	同上	テクニカルスタッフ	H20.12～H24.3
松浦 一真	同上	テクニカルスタッフ	H20.12～H23.3
高沢 航	同上	テクニカルスタッフ	H20.12～H23.3
河合 香里	同上	研究員	H21.2～H24.11
石垣 診祐	同上	特任助教	H22.4～H26.3
藤岡 祐介	同上	客員研究員	H22.10～H26.3
関口 香里菜	同上	テクニカルスタッフ	H22.4～H23.3

研究項目

- ・ 孤発性 ALS のモデル動物作成を通じた分子標的治療法開発
- ・ Dynactin 1 KO 線虫・マウスの作製と解析
- ・ 運動ニューロン特異的 TDP-43 KO マウスの作製と解析
- ・ TDP-43、FUS の機能解析と運動ニューロン変性への関与の解析

②「郭」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
郭 伸	東京大学大学院医学系研究科	客員研究員	H20.10～
日出山 拓人	東京大学	助教	H20.10～H25.3
山下 雄也	東京大学大学院医学系研究科	特任研究員	H20.10～
蔡 慧玲	同上	特任研究員	H22. 4～
寺本 さやか	同上	学術支援専門職員	H21. 4～
舘野 博宣	東京大学医学部附属病院	特定短時間勤務有期 雇用職員	H21. 4～H22.3
八賀 康祐	アドバンテージ・サイエンス	派遣職員	H21. 6～H24.4
金子 さおり	ワールドインテック	派遣職員	H21. 8～H24.4
横山 道子	東京大学医学部附属病院	特定短時間勤務有期 雇用職員	H21. 2～H22.4
山田 裕美子	同上	特定短時間勤務有期 雇用職員	H20.10～H21.3
栗林 香	同上	特定短時間勤務有期 雇用職員	H20.10～H21.5
松尾 瞳	同上	特定短時間勤務有期 雇用職員	H21. 2～H21.3
木村 大輔	慶應義塾大学 薬学部	修士 2 年	H20.10～H21.3

研究項目

- ・ ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを用いた孤発性 ALS の病態解析及び治療法開発基盤の確立

③「山中」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
山中 宏二	名古屋大学環境医学研究所	教授	H20.10～
小峯 起	同上	助教	H24.1～
山下 博史	京都大学医学研究科	助教	H20.10～
渡辺 祥司	理化学研究所脳科学総合研究センター	研究員	H20.10～H24.3
藤森 典子	同上	テクニカルスタッフ	H20.10～H25.3
久米 直子	同上	テクニカルスタッフ	H20.10～H25.3
片岡 礼音	同上	テクニカルスタッフ	H21.4～H23.9
築地 仁美	同上	研究員	H21.11～
金子 貢巳	同上	テクニカルスタッフ	H22.4～
佐藤 雅江	同上	テクニカルスタッフ	H22.4～H25.3
遠藤 史人	同上	リサーチアソシエイト	H22.4～
井上 育代	同上	テクニカルスタッフ	H23.4～H25.8
古屋亜佐子	同上	テクニカルスタッフ	H24.1～
渡邊 征爾	同上	研究員	H24.4～

研究項目

- ・ 孤発性 ALS モデルにおけるニューロン・グリア関連の解明と治療標的の同定
- ・ 孤発性 ALS における RNA 代謝異常の解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

TDP-43 および Dynactin-1 運動ニューロン特異的 KO マウスの開発に当たっては、慶応義塾大学薬学部薬理学・三澤日出巳教授、京都大学医学部神経内科・高橋良輔教授、東京女子医大神経内科・佐々木彰一准教授らと共同研究を行った。線虫モデルの作成・解析にあたっては名古屋大学大学院理学研究科・森郁恵教授との共同研究を行った。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 孤発性 ALS モデル動物開発・病態解析・治療標的の同定 (名古屋大学 祖父江グループ)

(1) Dynactin 1 を標的分子とする孤発性 ALS モデルの解析と治療法開発

近年オートファジーの異常が様々な神経変性疾患の病態に寄与していることが報告されており、ALS についても運動ニューロン内にオートファゴソームの蓄積が見られることが明らかとなっている。Dynactin 1 の機能異常による運動ニューロン変性の分子病態を明らかにするため、本研究では dynactin 1 とオートファゴソームの関係に注目して解析を行った。その結果、孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおける dynactin 1 の発現レベルとオートファゴソームのマーカーである LC3 の蓄積には逆相関がみられ、dynactin 1 の発現が低下している運動ニューロンではオートファゴソームの蓄積が高度に見られることが明らかとなった (Ikenaka et al., *PLoS One* 2013)。そこで、さらに両者の関係を詳細に解析するため、コリン作動性ニューロン (運動ニューロン) 特異的に *dnc-1* (dynactin-1 の線虫相同体) に対する shRNA と GFP を共に発現するベクターを用い、*dnc-1* ノックダウン線虫を作成した。線虫の運動機能は body bend assay, liquid thrashing assay, video capture analysis により解析した。運動ニューロンにおける軸索輸送については、線虫初代培養ニューロンを用いた time-lapse image および線虫を用いた kymograph により解析した。その結果、運動ニューロン特異的 *dnc-1* ノックダウン線虫は著明な運動機能障害および寿命短縮を呈し、孤発性 ALS 患者でみられるスフェロイドと類似の軸索腫大を早期から認め、加齢とともに軸索や細胞体の変性が進行した (図 1)。シナプス小胞関連蛋白質である synaptobrevin をマーカーとして kymograph を行うと、*dnc-1* ノックダウンにより順行性および逆行性軸索輸送が低下し、synaptobrevin が軸索内に蓄積することが明らかとなった。また、オートファゴソームのマーカーである Lgg-1 (LC-3 の線虫相同体) を用いて解析すると、スフェロイドにオートファゴソームの異常蓄積が認められ、その分子基盤として、*dnc-1* ノックダウン線虫ではオートファゴソームの順行性および逆行性軸索輸送の著明な低下が認められた。次に、オートファジーの賦活による運動ニューロン変性の抑制を試みた。その結果、オートファジーを活性化させる rapamycin の投与により運動機能の改善が見られたが、その効果は別のオートファジー賦活である飢餓による効果を下回るものであった。飢餓はオートファジーを活性化するのみならず、軸索輸送に必要なチューブリンのアセチル化を亢進することが示されているため、運動ニューロン特異的 *dnc-1* ノックダウン線虫に、チューブリンのアセチル化を介して軸索輸送を活性化させる trichostatin A を投与したところ、チューブリンのアセチル化が促進され、オートファゴソームの逆行性軸索輸送が活性化されるとともに、運動機能低下などの表現型の改善が見られた。また、trichostatin A による治療効果はオートファジーの阻害剤である 3-MA による相殺された。Rapamycin と trichostatin A を併用すると極めて強い治療効果が得られた。以上から、dynactin 1 の発現低下はオートファジーの軸索輸送障害を介して運動ニューロン変性を惹起しうること、dynactin 1 の発現低下によるニューロン変性に対して rapamycin や trichostatin A といった薬理的介入が治療効果を発揮することが示めされた。これらの結果から、運動ニューロン特異的 *dnc-1* ノックダウン線虫は孤発性 ALS の病態を再現するモデルであり、治療法のスクリーニングや更なる病態解析にとって有用であることが示唆され

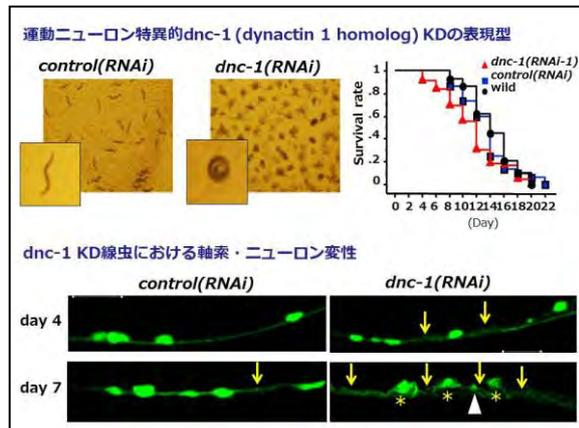


図 1 運動ニューロン特異的 *dnc-1* KD 線虫における運動機能障害および運動ニューロンの軸索変性 (矢印)、スフェロイド (矢頭)、細胞体変性 (*)

るモデルであり、治療法のスクリーニングや更なる病態解析にとって有用であることが示唆され

た。

(2) TDP-43, FUS/TLS を標的分子とする ALS モデルの開発と解析

孤発性 ALS の運動ニューロンにおいて TDP-43 は核から細胞質へ局在を変え凝集体として存在している。孤発性 ALS 運動ニューロンにおいて TDP-43 の機能喪失が想定されるため、運動ニューロン特異的 TDP-43 ノックアウト(KO)マウスにおける運動機能解析や病理学的検討を行った(Iguchi et al., *Brain* 2013)。運動ニューロン特異的 TDP-43 KO マウスは VAcHt-Cre マウスと TDARDBP-LoxP マウスを交配することにより作成し、その結果脊髄前角の運動ニューロンの約 50%で TDP-43 の発現がノックアウトされることを確認した。運動ニューロン特異的 TDP-43

KO マウスは 50 週頃より体重減少や運動機能障害が現れ始め、100 週齢ではコントロールに比し有意な体重減少、歩幅や rotarod における有意な成績低下が観察された。病理学的には TDP-43 陰性の脊髄運動ニューロンの萎縮、腰髄前根の軸索変性像や有髄神経の小径化、腓腹筋に群集萎縮がみられ、神経筋接合部における脱神経所見も認められた(図2)。これら運動ニューロン変性を示唆する病理学的変化は運動機能障害の出現よりやや遅れて 80 週齢頃から観察された。脳神経核の検討では三叉神経運動核や顔面神経核、舌下神経核には萎縮を認めたが、動眼神経核や外転神経核は保たれていた。運動ニューロンの機能を解析するため fluoro-gold を用いた逆行性標識を行ったところ、運動ニューロン特異的 TDP-43 KO マウスの腰髄前角ではトレーサーによって標識される運動ニューロンの数が野生型マウスの 30%程度に減少しており、運動ニューロンの機能障害が確認された。また、免疫染色にて脊髄前角にアストロサイトの増生がみられ、萎縮した脊髄運動ニューロン内にリン酸化ニューロフィラメントやオートファゴソームの蓄積が観察された。オートファゴソームの蓄積しているニューロンは他のニューロンに比べて萎縮の程度が強いことから、オートファジーの異常が運動ニューロン変性の重症度に関連していると考えられた。運動ニューロン特異的 TDP-43 KO マウスは長期にわたる経過で運動ニューロン変性を引き起こし、病理学的にも孤発性 ALS に類似した特徴を有していた。本研究により TDP-43 が哺乳類の運動ニューロンの機能維持に必要不可欠であることが明らかとなり、および孤発性 ALS の病理学的特徴である TDP-43 の核外脱出が本疾患の分子病態に深く関与していることが示唆された。

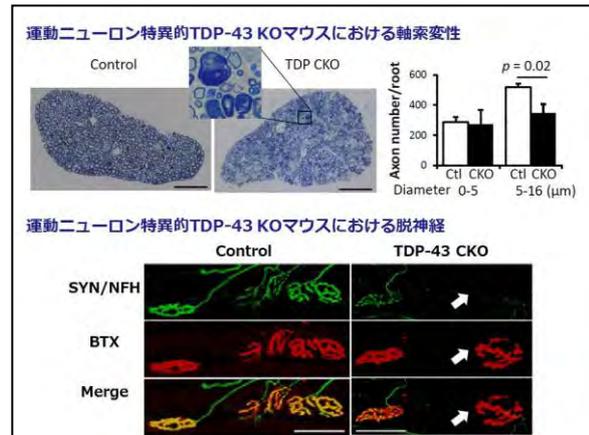


図2 運動ニューロン特異的 TDP-43 KO マウスの前根における運動軸索変性および神経筋接合部における脱神経

(3) TDP-43・FUS の発現抑制による運動ニューロン障害の分子基盤の解明

Neuroblastoma cell-line (Neuro-2a 細胞)に対して siRNA により TDP-43 のノックダウンを行い、ニューロンに与える影響について生化学的・細胞生物学的に解析した。その結果、2 種類の TDP-43 siRNA について、蛋白、mRNA レベルでの有効なノックダウン効果が確認された(Iguchi et al., *J Biol Chem* 2009)。TDP-43 ノックダウンにより細胞の viability は有意に低下し、死細胞数も有意に増加した。神経突起はコントロールに比し TDP-43 ノックダウンで有意に伸張が阻害された。軸索伸長に深く関与する Rho family である RhoA, Rac1, Cdc42 に注目し検討したところ、TDP-43 ノックダウンにより RhoA, Rac1, Cdc42 の活性が一様に低下した。その機序として、TDP-43 ノックダウンによ RhoA, Rac1 の geranylgeranyl 化が著明に抑制され、これらの分子の細胞膜への移行が阻害されていることが明らかとなった。これらの TDP-43 ノックダウンによ

る細胞障害は geranylgeranyl 化の基質である GGPP を加えることによって改善し、さらに GGTI を用いて geranylgeranyl 化を抑制すると、TDP-43 ノックダウンと同様に viability の低下と神経突起の伸張阻害が確認された。以上から TDP-43 の Loss of function により geranylgeranyl 化が障害されることによる Rho family GTPase の活性低下を介した神経変性を起す可能性が示唆された。

一方、家族性 ALS 原因遺伝子の一つであり、TDP-43 と構造上の類似点を多く有する RNA 結合タンパク質である FUS についても、その機能喪失に伴う運動ニューロン変性のメカニズムについて解析した。FUS に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを野生型マウス大脳皮質ニューロンに感染させ、exonarray による網羅的な遺伝子発現および alternative splicing 解析を行った。また同時に行った mouse brain を用いた HITS CLIP との検討から FUS がターゲットとする pre mRNA の cassette exon の上流 intron に位置特異的に結合することが判明した (Ishigaki et al., *Sci Rep* 2012)。またこの exonarray の結果より、FUS がタウをコードする Mapt 遺伝子の exon10 のスプライシングを直接制御することを見出した。Exon10 の有無は Tau の 3-repeat/4-repeat の isoform の違いを反映するため、tauopathy でもある FTLD の病態と密接に関連するものと推測された。さらに、FUS による RNA スプライシング・遺伝子発現の細胞種による相違と ALS の病変部位特異性の関連を明らかにするため、FUS に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを野生型マウス運動ニューロンと小脳顆粒細胞に感染させ、上記と同様の exonarray による網羅的な遺伝子発現および alternative splicing 解析を行った。その結果、運動ニューロンにおける RNA スプライシングや遺伝子発現の変化は、大脳皮質ニューロンのそれらに近似していたが、小脳ニューロンの結果とは大きく異なっていた (Fujioka et al., *Sci Rep* 2013)。また、ニューロンとグリアとの比較では、遺伝子発現の変化には共通性が認められたが、RNA スプライシングには共通性が少なく、遺伝子発現より RNA 代謝のほうがより細胞特異性に寄与していることが示唆された。

(4) TDP-43 の運動ニューロン内凝集メカニズムの解明

孤発性 ALS や FTLD の変性部位のニューロンやグリア細胞において TDP-43 は細胞質に局在を変え、凝集(不溶化)し、C 末端の過剰リン酸化、C 末端の断片化といった翻訳後修飾を受けている。孤発性 ALS において、こうした TDP-43 の翻訳後修飾がどのようなメカニズムで生じるのか不明であったが、本研究において神経系の培養細胞とマウスの初代神経細胞において、エタクリン酸を投与して抗酸化作用を有するグルタチオンを枯渇させることにより酸化ストレスを誘導すると、TDP-43 が核から細胞質に移行するとともに、不溶化、リン酸化や断片化といった孤発性 ALS で見られる TDP-43 の異常修飾が生じることを明らかにした(図 3) (Iguchi et al., *J Biol Chem* 2009)。

さらに、別の酸化ストレス誘導剤である過酸化水素によっても同様の TDP-43 の病的修飾が見られた。他のグループからの報告でも、酸化ストレスが TDP-43 の細胞質移行を促進し、システイン残基の酸化などを介して TDP-43 の凝集を促すことが示されている。これらの所見から、酸化ストレスは TDP-43 の細胞質移行、断片化、ユビキチン化およびリン酸化を誘導し、ALS の病態に寄与することが示唆される。すなわち、酸化ストレスが老化と運動ニューロン変性の関連を握る鍵となると考えられる。

TDP-43 は 2 つの RNA 結合ドメインを持ち、C 末にプリオン様ドメインを持つ核蛋白であるが、

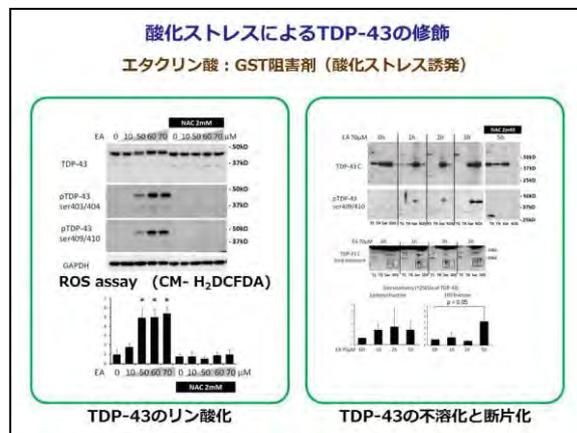


図 3 酸化ストレス誘導剤であるエタクリン酸による TDP-43 のリン酸化・不溶化および断片化

上記の TDP-43 の凝集や修飾といった ALS 特異的变化にかかわるドメインは不明であった。本研究において我々は、TDP-43 の様々な断片を作成し、それを神経系細胞株である NSC34 細胞に強制発現させることで、TDP-43 の病的変化に寄与するドメインの同定を試みた。その結果、32kDa の C 末断片を細胞に発現させると細胞質内に TDP-43 の凝集体が形成され、それらはユビキチン化・リン酸化を受け、不溶化していることが明らかとなった (Takagi et al., *PLoS One* 2013)。一方、35kDa の C 末断片や核移行シグナルの変異体では、TDP-43 の核外脱出は認められるものの、凝集や修飾といった ALS でみられる変化は認められなかった。32kDa と 35kDa 断片の差として、RNP2モチーフ (LIVLGL) に注目し、このモチーフを欠損・変異させた TDP-43 の変異体を作成し、同様に NSC34 細胞に強制発現させたところ、32kDa 断片と同様に細胞質内に TDP-43 の凝集体が形成され、それらはユビキチン化・リン酸化を受け、不溶化していることが明らかとなった。さらに、この凝集体には 14~25kDa 程度の TDP-43 の C 末断片が含まれていることが示され、孤発性 ALS でみられる凝集体と類似した性質を有していることが示唆された。RNA 結合能の喪失が TDP-43 の凝集に寄与していることを検証するため、TDP-43 を強制発現した細胞 lysate を RNase で処理したところ、試験管内で TDP-43 の凝集が再現された。以上から、TDP-43 の RNP2 モチーフは TDP-43 の凝集や修飾といった ALS 特異的变化に関与しており、RNA 結合能の低下が ALS における TDP-43 病変の基盤にあると考えられた。

(5) ALS モデルマウスを用いた分子標的治療法の開発

レーザーマイクロダイゼクションで得られた孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンの mRNA 網羅的解析により、同細胞で c-Abl の発現量が増加していることを明らかにしている (Jiang et al., *Ann Neurol* 2005)。本研究では、変異 SOD1 の過剰発現モデル、および孤発性 ALS において c-abl の発現上昇および活性亢進を確認し、c-abl 阻害薬である dasatinib の有効性を変異 SOD1 (G93A) マウスで検証した。その結果、正常 SOD1 および変異 SOD1 (G93A, G85R) を NSC43 細胞に過剰発現させたところ、変異 SOD1 の過剰発現により c-abl の発現量およびそのリン酸化が誘発されることが、ウエスタンブロットにより示された (Katsumata et al., *PLoS One* 2012)。同培

養細胞に c-abl 阻害剤である dasatinib を投与したところ、cell viability assay 及び LDH assay がともに改善し、dasatinib が変異 SOD1 過剰発現による培養細胞毒性を緩和することが明らかとなった。また、免疫染色及びウエスタンブロットにより、変異 SOD1 (G93A) マウスおよび孤発性 ALS の腰髄前角の運動ニューロンにおいてコントロールに対して c-abl の発現上昇、リン酸化亢進が示された。さらに dasatinib を変異 SOD1 (G93A) マウスに投与したところ、dasatinib 投与群 (25mg/kg/day) ではプラセボ投与群 (0mg/kg/day) に比べ有意な生存率の改善および運動ニューロン死の抑制が認められた (図 4)。また、変異

SOD1 (G93A) マウスに対する dasatinib 投与により、脊髄における c-abl の発現量およびリン酸化がともに抑制され、活性型 caspase-3 が低下し、神経筋接合部における innervation が回復した。さらに、ウエスタンブロットでは dasatinib 投与により変異 SOD1 (G93A) マウス脊髄内の c-Abl のリン酸化が低下していたことから、dasatinib の経口投与により脊髄内に移行すると考えられた。さらに、ヒトの孤発性 ALS 腰髄組織を用いて免疫染色・ウエスタンブロットを検討したところ、ヒト ALS 腰髄運動神経細胞内でも c-Abl が活性化していることが明らかとなった。

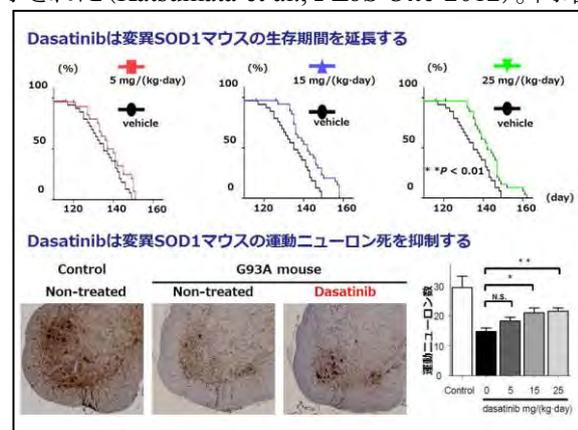


図4 変異 SOD1 マウスにおける運動ニューロン変性に対する c-Abl 阻害剤の治療効果

3.2 ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを用いた孤発性 ALS の病態解析及び治療法開発基盤の確立(東京大学 郭グループ)

(1) 孤発性 ALS 患者剖検組織を用いた疾患関連分子異常の解析

孤発性 ALS の大多数の症例では遺伝性 ALS に見出された責任遺伝子の変異は見出されていない。本 CREST 事業が開始された時点(2008 年 10 月)以降、数々の家族性 ALS 責任遺伝子が新たに同定されたが、本邦孤発性 ALS におけるこの状況に変化はない。一方で、単一運動ニューロンにおける解析から、孤発性 ALS 運動ニューロンには、疾患特異的、部位選択的に、AMPA 受容体 GluA2(従来 GluR2、GluR-B 等とも呼ばれた)サブユニットのグルタミン・アルギニン(Q/R)部位の RNA 編集低下が生じていることは、少数例(9 例における前角細胞組織での検討 [Takuma et al., *Ann Neurol* 1999]、5 例における単一運動ニューロンにおける検討 [Kawahara et al., *Nature* 2004])での検討であったものが、症例数を増やしての検討でも、検討症例全例(30 例以上)で見られたことにより更に確たるものになった(Hideyama et al., *Neurobiol Dis* 2012)。

GluA2 Q/R 部位は RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2)により特異的に RNA 編集を受ける。すなわち GluA2 遺伝子の転写後、ゲノム上の Q コドン CAG のアデノシン(A)が脱アミノ反応によりイノシン(I)に置換される(A-to-I 置換)。イノシン(I)は翻訳時にグアノシン(G)として認識されるため、ゲノム上の CAG は CIG すなわち CGG として認識される。CGG がアルギニン(R)コドンであるため、アミノ酸レベルでの Q-to-R 置換が起こる。この反応はヒト、哺乳類の脳・脊髄、特にニューロンでは 100%の効率で起こっている。ADAR2 がこの反応を特異的に触媒することから、孤発性 ALS 運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下しているという予測が立てられた。30 例近くの剖検脊髄組織を用いて、単一運動ニューロン、組織レベルで調べてみると、3 種類の ADAR family に属する RNA 編集酵素(ADAR1~ADAR3)の内、ADAR2 の発現レベルのみが孤発性 ALS で有意に低下していることが分かり、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集効率低下は ADAR2 の発現低下が原因であることが分かった(Hideyama et al., *Neurobiol Dis* 2012)。さらに、個々の運動ニューロンを調べてみると、同一症例の中に、正常と同様に編集型 GluA2 のみを発現しているものと、未編集型 GluA2 を発現しているものがあるが、前者の運動ニューロンにおいても既に ADAR2 の発現レベルの低下が起こっていること、後者ではその低下が高度であることが分かり、進行性の ADAR2 低下が未編集型 GluA2 の発現の原因メカニズムであることが明らかになった(Hideyama et al., *Neurobiol Dis* 2012)。

上記した患者の剖検組織に見られる分子変化が疾患特異的であることは、正常対照、疾患対照での検討から明らかであり、特に、遺伝性 ALS である、SOD1 関連 ALS の運動ニューロンや、同じ運動ニューロン病であるアンドロゲン受容体の変異による球脊髄性筋萎縮症の運動ニューロンには見られない(Kawahara et al., *Neurosci Res* 2006)。この分子異常は孤発性 ALS に特化した病因関連分子異常であることが示唆されたため、その証明のために、この分子病態を再現するモデルマウスを作成した。

(2) 疾患特異的分子変化の分子病態モデルマウスの開発

Cre/LoxP 系により運動ニューロン選択的な ADAR2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス ADAR2^{lox/lox}/VChT-Cre (以下 AR2) マウスを開発した(Hideyama et al., *J Neurosci* 2010)。マウス ADAR2 遺伝子 *Adarb1* の ADAR2 活性基部分のエクソン 3 個を挟む前後のイントロン部それぞれに 1 個ずつの LoxP 配列を挿入した ADAR2^{lox/lox} マウスと、アセチルコリントランスポータープロモーター依存性に Cre を発現する VChT-Cre マウスを交配し、運動ニューロン選択的に ADAR2 をノックアウトする事を目論んだものである。上記の分子変化が孤発性 ALS における運動ニューロン死の原因であれば、この分子病態を反映するモデルマウスにおいても運動ニューロン死が起こると考えた。また、ヘテロ接合体 AR2H (ADAR2^{+/lox}/VChT-Cre) マウスは一方の ADAR2 アリルを発現するので、ADAR2 活性が野生型のおよそ 1/2 に落ちており、より ALS の病態に近いといえるため(Hideyama et al., *Front Mol Neurosci* 2011)、孤発性 ALS の病因関連分子異常であれば運動ニューロン死を引き起こさずである。また、これとは別に、

内因性 GluA2 遺伝子を、編集型 GluA2 を発現する遺伝子に改変した GluR-B^{R/R} マウスと AR2 マウスの交配により、ADAR2 活性なしに編集型 GluA2 を発現する変異マウス AR2res マウスを開発し、GluA2 Q/R 部位以外の ADAR2 RNA 編集部位が運動ニューロン死に関与するかどうかの解析を行う事で、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集の有無が運動ニューロン死にどのように関わるかを検討した。

これらマウスの解析から、1) AR2 マウスは生後 1 ヶ月以降、凡そ半年の経過で、運動機能の進行性の低下を示すこと、2) 同様の時間経過で進行する運動ニューロンの変性脱落が起こり、それに伴う神経筋単位の変化が見られること、3) すなわち進行性の運動ニューロンの変性脱落による進行性の運動機能低下という ALS 相同の臨床像を呈することが明らかになった。運動機能低下、運動ニューロン変性の時間経過は、Cre が生後発現しはじめ、5 週間までに運動ニューロンの凡そ半分に発現することに伴う ADAR2 遺伝子のノックアウトに引き続くもので、ADAR2 のノックアウト後に比較的緩徐な経過で運動ニューロン死が進行することが明らかになった。さらに、Cre は運動ニューロンの凡そ 50% に発現するが、残りの Cre を発現しない運動ニューロンでは ADAR2 活性が正常に保たれ、正常に機能していること、したがって、生後 6 ヶ月以降は低レベルの運動機能は保たれ、生後 1 歳前後でおこる個体死までの低レベルの運動機能維持に役立っていることが明らかになった。したがって、AR2 マウスは孤発性 ALS の分子病態を反映するモデルマウスであり、ADAR2 を欠損した運動ニューロンの動態を解析することは孤発性 ALS の病態解析に大いに役立つことが期待された。また、ヘテロ接合体 AR2H マウスの解析からは、未編集型 GluA2 が全 GluA2 の数%~20%前後であっても、12 か月齢では運動ニューロン死が起こっていることから、未編集型 GluA2 の発現自体が運動ニューロン死を引き起こしうる分子変化であることが示唆された。AR2res マウスの解析から、ADAR2 を欠損していても GluA2 Q/R 部位の RNA 編集が保たれ、全ての GluA2 が編集型であれば運動ニューロン死が起こらないことから、GluA2 Q/R 部位以外の ADAR2 編集部位の RNA 編集の有無は運動ニューロン死に関与しないことが明らかになった (Hideyama et al., *J Neurosci* 2010)。

ALS では運動ニューロンでありながら外眼筋支配ニューロン(動眼・滑車・外転神経核のニューロン)には変性が起こりにくいことが知られている。AR2 マウスでは ADAR2 の欠失は全てのニューロンの細胞死の原因になるわけではなく、ALS 同様外眼筋支配脳神経核のニューロンは ADAR2 が欠失していても細胞死に陥らないことが明らかになり、ニューロンによりこの分子変化への脆弱性に違いがあることが分かった (Hideyama et al., *J Neurosci* 2010)。

運動ニューロンに選択的な緩徐・進行性の変性脱落による進行性の運動機能低下、運動ニューロンにおける ALS 様選択性より、AR2 マウスが孤発性 ALS の分子病態、臨床像をかなり忠実に再現するモデルマウスであることが明らかになり、孤発性 ALS の病態解析、治療研究に有用なモデルであると考えた。また、AR2 マウスの解析から、孤発性 ALS に見出された疾患特異的分子変化が疾患と如何関わっているかの理解が進んだ。すなわち、1) ADAR2 活性の低下は運動ニューロン死を引き起こすこと、2) ADAR2 が触媒する RNA 編集部位は多数在るが、GluA2 pre-mRNA Q/R 部位の A-to-I 置換が起こらないことのみが運動ニューロン死を引き起こす分子変化であること、3) 運動ニューロンが ADAR2 活性低下に依り細胞死に陥らないためには、その運動ニューロンが発現する GluA2 全てが Q/R 部位編集型である必要があること、そのためには片方の ADAR2 アリルの発現のみ(野生型における活性のおよそ 50%) では不十分であること、などである。また、孤発性 ALS 運動ニューロンでは、ADAR2 mRNA の発現量が正常対照の 50% 以下に低下しているため、この mRNA 発現量の低下は ADAR2 活性が低下し、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集異常を引き起こすレベルであり、運動ニューロン死の直接原因となっていることを示しており、孤発性 ALS の病因に密接に関連することが証明された。孤発性 ALS 運動ニューロンでは、ADAR2 発現が進行性に低下していると予測されるが、或る閾値を超えた低下に依り初めて未編集型 GluA2 が発現し、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体を介する細胞死カスケードが始まることを示している。我々は、上記の結果から孤発性 ALS の「ADAR2-GluA2 仮説」を提唱した (Hideyama et al., *Front Mol Neurosci* 2011)。

(3) 孤発性 ALS の病理学的指標である TDP-43 病理との分子連関の解析

孤発性 ALS の大多数の症例には凡そ半数の残存運動ニューロンに TDP-43 病理が観察されることが 2006 年に報告され (Arai et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2006; Neumann et al., *Science* 2006)、その後の検討から、孤発性 ALS の神経病理学的指標と考えられるようになっていく。我々の発見した ADAR2 発現低下、Q/R 部位未編集型 GluA2 発現も大多数の孤発性 ALS 運動ニューロンに観察される分子異常であることから、両者の分子連関を患者脊髄組織を用いて免疫組織化学的に調べた。その結果、TDP-43 病理が観察される運動ニューロンには ADAR2 の免疫活性が欠如しており、逆に TDP-43 病理が観察されない運動ニューロンには ADAR2 の免疫活性があることが明らかになった (Aizawa et al., *Acta Neuropathol* 2010)。このことは、ADAR2 の発現低下と TDP-43 病理の形成との間には密接な分子連関があること、すなわち TDP-43 病理形成が ADAR2 活性低下を引き起こしている、逆に ADAR2 活性低下が TDP-43 病理の原因になっている、可能性のどちらか、ないし別の分子異常が同時に両者を引き起こしている可能性を示唆している。

TDP-43 病理は、TDP-43 の正常な局在である核からの喪失、異常な細胞質封入体の形成からなり、TDP-43 の断片化、リン酸化という質的变化を伴っている。様々な研究者の解析により、TDP-43 の断片化が局在の異常、リン酸化を引き起こす誘因になっていると考えられていた。そこで、TDP-43 病理の形成が ADAR2 発現に影響する可能性を検討するために、培養細胞系を用いて、TDP-43 全長、C 末端断片、ALS 関連変異 TDP-43 全長および C 末断片の過剰発現、TDP-43 のノックダウンを行い、ADAR2 発現レベルの変化を調べた。その結果どれも有意な変化がなく、TDP-43 病理形成自体が ADAR2 発現に影響を及ぼす可能性は低いと結論した (Yamashita et al., *Neurosci Res* 2012)。

次に、ADAR2 の発現低下が TDP-43 病理形成の誘因になる可能性を AR2 マウスで検討した。脊髄の TDP-43 免疫組織染色では AR2 マウスでは野生型マウスニューロンに見られる核の TDP-43 染色性を失った運動ニューロンがあり、これらは全て ADAR2 の免疫活性も失っていた。ヘテロ接合体 AR2H マウスでは細胞質に多数の TDP-43 陽性凝集体が見られ、核の染色性を失った運動ニューロンも一部に見られ、ALS 運動ニューロンに相当する所見が得られた。この所見から、ADAR2 発現低下が TDP-43 病理の誘因になっている可能性が高いと結論づけた (Yamashita et al., *Nat Commun* 2012)。

我々が提唱した ADAR2-GluA2 仮説 (Hideyama et al., *Front Mol Neurosci* 2011) は、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体発現が、シナプスからの Ca²⁺流入増大を介して運動ニューロン死を引き起こすというものである。細胞質の Ca²⁺濃度上昇が TDP-43 病理形成に関与していることが想定された。また、先述したように、TDP-43 の断片化が TDP-43 病理の最も早期に起こる変化である可能性が高いとされていたため、Ca²⁺シグナリング異常が TDP-43 病理形成に関与していると考えられた。AR2 マウス脊髄組織を解析してみるとカルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインがカスパーゼ3とともに活性化していることが明らかになった。興味深いことに、カルパインは TDP-43 を特異的に断片化し、主要な 3 つの断片に切断すること、これら主要断片は N 端断片であり、その内の 2 種は高い易凝集性を持つこと、カルパインはこれら主要断片を更に可溶性断片に切断すること、を *in vitro* 実験系で明らかにした。一方カスパーゼ3には有意な TDP-43 切断活性が見られなかった。また、AR2 マウスにみられた ALS 運動ニューロンに見られる TDP-43 病理と相同の TDP-43 の局在異常が AMPA 受容体からの過剰な Ca²⁺流入が引き起こすカルパインの活性化に依ることをカルシウム非透過性 AMPA 受容体を発現するマウスと AR2 を交配した AR2res マウスおよびカルパスタチン (カルパインの内因性インヒビター) のトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスの解析から明らかにした。さらに、ALS 患者剖検脳脊髄にはカルパイン断片相当の C 端を含まない断片が多量に存在することも確認し、ALS の病的脳で活性化しているカルパインが TDP-43 の異常な断片化を引き起こしている可能性が示唆された (Yamashita et al., *Nat Commun* 2012)。

上記の結果は、ALS 運動ニューロンでは、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体発現がシナプスからの Ca²⁺流入増大、カルパインの活性化を介して TDP-43 病理形成の誘因になっているメカニズムを意味している。カルパインの活性化が TDP-43 病理の誘因である可能性は、ALS 運動ニューロン以外にも観察される TDP-43 病理一般に通ずる可能性が高い。さらに、N 端断片に高い易

凝集性が証明され、従来言われてきた C 端断片や全長 TDP-43 の存在は、カルパインの活性化以後に生ずる他のプロテアーゼの活性化や、核・細胞質をシャトルする TDP-43 の凝集体への巻き込み依る二次的な凝集による可能性があることも示され、核からの喪失という TDP-43 病理の特徴をも説明する点で重要な所見であるといえる (Yamashita et al., *Nat Commun* 2012)。

TDP-43 病理は孤発性 ALS 以外にも、TDP-43 をコードする遺伝子である *TARDBP* 変異に伴う ALS の運動ニューロンに見出される。従来なぜ病理学的に区別できない TDP-43 病理が *TARDBP* に変異のない孤発性 ALS と変異を持つ *TARDBP* 関連 ALS の運動ニューロンに観察されるのかを説明する分子メカニズムは不明であった。カルパインの切断が TDP-43 病理の誘因であることを示した今回の結果から、変異 TDP-43 のカルパイン切断を調べてみると、野生型に比べより脆弱であることが明らかになった。さらに、運動ニューロンでは生理的に発現している Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の割合が高いためにカルパイン活性が他のニューロンより高く、変異 TDP-43 を切断しやすい環境にあることも明らかになった。このことから、TDP-43 病理はカルパインによる TDP-43 の切断が亢進することが誘因になること、孤発性 ALS ではカルパインの異常な活性化がその原因となり、*TARDBP* 関連 ALS ではカルパインの基質である変異 TDP-43 の脆弱性亢進がその原因であることが示唆され、異なったメカニズムで同一の形態的異常が観察されることが示された (Yamashita et al., *Nat Commun* 2012)。

一方、高齢になるほど TDP-43 病理が高率に観察され、正常対照高齢者においても一部のニューロンに TDP-43 病理が観察されることが報告されていた。また、ALS の発症は高齢者ほど多く、また高齢発症の ALS 患者ほど ALS

の進行が速い事が知られており、加齢は ALS の最大の危険因子であるとされながら、その分子基盤は明らかでなかった。高齢マウスの脊髄運動ニューロンを免疫組織化学的に観察すると、1.5 歳齢を超えると年齢と共に一部の運動ニューロンに TDP-43 の局在異常が観察されるようになり、同時に ADAR2 の核の染色性が失われることに気づいた。このような運動ニューロンが発現している GluA2 の Q/R 部位 RNA 編集率を調べてみると 100% 未満であり、加齢と共に 100% 未満のニューロン数が増加することが分かった。さらに、脊髄前根軸索の観察からは高齢マウスにおける前根軸索では変性軸索が増加していることが分かった。このような観察から、脊髄運動ニューロンでは加齢依存性の ADAR2 の発現低下が起こり、ALS 発症率・進行促進の加齢依存性の分子メカニズムになっている可能性を考察した (Hideyama et al., *PLoS One* 2012)。

以上の研究結果は図 5 の様な分子カスケードとしてまとめられ、孤発性 ALS の病因関連分子間つながりのみならず、遺伝性 ALS や、ALS に特異的な TDP43 病理が他の疾患にも観察されるメカニズムの一端を理解する上に役立つと考えられる。

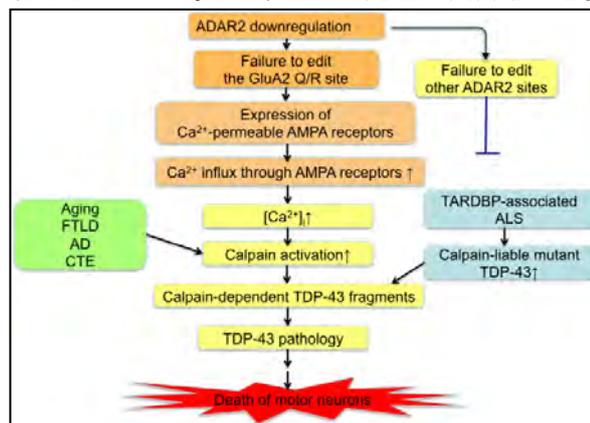


図 5 本研究から想定される孤発性 ALS 運動ニューロンにみられる疾患特異的分子異常間、および、高齢者の脳・脊髄、*TARDBP* 関連 ALS (*TARDBP*-associated ALS) 前頭側頭葉変性症 (FTLD)、アルツハイマー病 (AD)、慢性外傷性脳症 (CTE) にみられる TDP-43 病理形成の分子カスケード

(4) AAV-ADAR2 を用いた治療研究

以上に述べたように、AR2 マウスは孤発性 ALS 患者組織に見出された疾患特異的分子異常を再現する分子病態モデルとして開発したが、表現型・形態学的異常も ALS をよく反映していることが明らかになり、ALS に観察される臨床症状、神経病理学的所見の理解を進めた。我々の提唱する ADAR2-GluA2 仮説は孤発性 ALS の病理学的指標である TDP-43 病理の誘因になっている点も、ALS の病因に関連することが示唆される。そのため、このモデルマウスを用いれば従来の SOD1 トランスジェニックマウスを用いたものより遥に正確に治療効果判定が可能に

なると考え、ADAR2-GluA2 仮説に基づき、解明された分子カスケードの最も上流にある ADAR2 の発現低下を正常化することによる治療法開発を試みた。すなわち、ADAR2 遺伝子を運動ニューロンに送達し、ADAR2 活性を正常化し、細胞死に至る分子カスケードの正常化を目指すというものである。

ALS は、脳幹、頸髄、胸髄、腰髄を中心として分布する運動ニューロンに順次変性が広がっていく疾患であるので、遺伝子は空間的に広汎な部位に散在する運動ニューロン全てに効率よく送達する必要がある。そのためには、遺伝子を局所に投与する方法より、血流や髄液流を利用して広く送達する方法の方が圧倒的に優れている。経血管的投与は血液脳関門のために効率よく運動ニューロンに送達することが困難であるとされてきた。最近、アデノ随伴ウイルス(AAV)の一部のセロタイプは比較的高率に中枢神経に感染することが示され、自治医科大学村松慎一教授との共同研究において、マウスで経血管的に運動ニューロンに効率よく遺伝子を送達・発現させることが可能になった。このことにより、ヒト ADAR2 cDNA (hADAR2)をこの血管投与型 AAV により中枢神経に送達し、神経特異的プロモーターにより発現させることにより、末梢臓器や、中枢のグリア細胞での遺伝子発現を抑え、神経特異的に ADAR2 を発現することで ALS のモデルマウスの治療を試みた (Yamashita et al., *EMBO Mol Med* 2013)。

AAV9-hADAR2 2.14×10^{12} vg/body を AR2 マウス (9-16 週齢; n=16) 尾静脈に投与し、運動機能をロータロッド、自発運動量で評価した。ロータロッドスコアを指標とし、未発症時期の投与 (n=11) の他、臨床的には発症後の投与になる事を想定した発症後の投与 (n=5) も行った。エンドポイントをロータロッドスコアの低下 (10 秒以下) ないし 36 週齢のいずれか早い時点で設定し、効果判定は、行動変化の他、前角運動ニューロン数、脊髄前根軸索数、ADAR2 mRNA 発現量、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率、免疫組織化学的な TDP-43 の局在の非投与群との比較で評価した。

その結果、非投与群では進行性の運動機能低下がみられたのに対し、投与群では、発症後投与群においてもロータロッドスコアの低下が観察期間終了時まで完全に抑えられた。非投与群との比較において、投与群では、残存前角運動ニューロン数・前根軸索数は有意に多く、ADAR2 mRNA の発現はマウス ADAR2 には有意差が無いがヒト ADAR2 mRNA を含めた総 mRNA が 1.5 倍に増加していた。前角組織での GluA2 Q/R 部位の編集効率は有意に高く、TDP-43 が核に局在する運動ニューロン数が有意に多かった。この結果は、未編集型 GluA2 を含む Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の発現を介した運動ニューロン死が完全に抑えられたことを意味しており、経静脈的ルートによる AAV9 ベクターを用いたヒト ADAR2 cDNA の送達が GluA2 Q/R 部位の RNA 編集を完全に行えるに必要なレベルに ADAR2 活性を回復し得たことを意味している。

しかも、末梢臓器での遺伝子発現はなく、中枢神経における hADAR2 を発現するニューロン (Flag タグにより識別可能) 周囲にはアストロサイトやミクログリアの増勢などの炎症を示唆する変化も観察されず、一回のベクターの投与で、検出可能な副作用なしに運動ニューロン選択的に目的の遺伝子を長期間 (少なくとも観察期間である約半年) 発現させる事に成功したといえる。

AR2 マウスで神経細胞死に陥る運動ニューロンは ADAR2 の発現を完全に欠失しているのに対し、孤発性 ALS の運動ニューロンでは、ある程度の ADAR2 mRNA 発現は保たれており、ノックアウトマウスよりハードルは低いと考えられる。この結果は、少なくともマウスにおいては、経

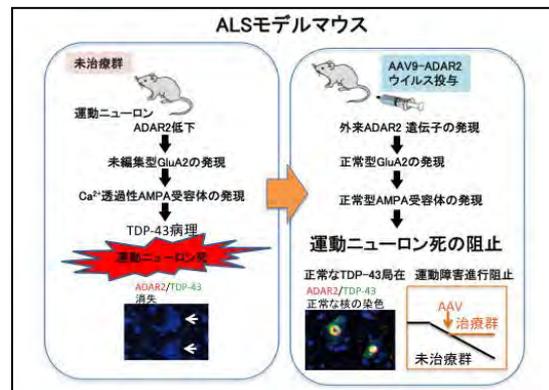


図6 AAV-ADAR2 ウイルスを用いた ALS の治療戦略 ALS モデルマウス (AR2) の病態 (左) および AAV-ADAR2 ウイルスの治療効果 (右) を示す。AR2 マウスの運動ニューロンでは ADAR2 低下から運動ニューロン死までのカスケードをとり、核の ADAR2 が消失すると TDP-43 も消失する。AAV-ADAR2 ウイルスを投与すると全て b の病態過程が緩和あるいは回復し、運動ニューロン死も阻止することができた。また消失した TDP-43 の発現も回復した。

静脈的ルートからの ADAR2 遺伝子送達により ADAR2 を欠失していても GluA2 Q/R 部位の RNA 編集を 100% に回復するのに必要なレベルの ADAR2 活性が得られ、この方法で ALS 症状の進行を止められることを示している。われわれの ADAR2-GluA2 仮説が孤発性 ALS に当てはまるのであれば、この方法により孤発性 ALS の進行を食い止めることが可能であると考えられる (図 6)。

3.3 孤発性 ALS モデルにおけるニューロン・グリア関連・RNA 代謝異常の解明(名古屋大学山中グループ)

(1) 孤発性 ALS モデルマウスの開発と検証: TDP-43

TDP-43 の gain of function モデル (TDP-43 トランスジェニックマウス)

研究実施内容: 孤発性 ALS の運動ニューロンでは、核に主として局在する TDP-43 タンパク質の発現が核から消失し、細胞質に異常蓄積していることが病理学的検討から報告されている。また、TDP-43 のミスセンス変異は優性遺伝性 ALS の原因遺伝子として報告されている。これらの知見から、TDP-43 の機能異常が ALS の運動神経変性に深く関与していると推察される。その機序は、核における TDP-43 の機能喪失(loss of function)、TDP-43 の毒性獲得(gain of function)、あるいは両者の複合要因によると考えられるが、その詳細は不明であった。

そこで、TDP-43 の gain of function 仮説に基づいた動物モデルを作製して検証を行った。まず、内在性 TDP-43 プロモーターを用いて TDP-43 遺伝子を全身に発現するトランスジェニックマウスを作製したが、F1以降の世代においてタンパク質発現量が極めて低く、内在性 TDP-43 に比べてトランスジーン由来のタンパク質の十分な発現が得られなかった。そのため方針を変更し、神経系に高発現するマウスプリオンプロモーターを用いて TDP-43 およびその変異体のトランスジェニックマウスを作成し、マウスの系統化とその初期表現型観察を行った。TDP-43 は核内移行シグナル(NLS)および核外移行シグナル(NES)を有し、主に核内に局在して核—細胞質間を移動していると考えられる。そこで、TDP-43 野生型(WT)、核外移行シグナル変異(dNES)、N 末端欠失変異(C 末端部分のアミノ酸 208-414 を発現する変異体:R208)を作製し、これらを F5 世代まで安定して発現する個体を得ることができ、系統化に成功した。

(2) ALS 関連遺伝子発現解析: TDP-43

1. TDP-43による RNA 代謝異常の解明

研究実施内容: TDP-43 はスプライシングをはじめとして多面的に RNA 代謝に関与していることが知られている。神経系に関わる生理機能を明らかにするため、培養細胞を用いて、TDP-43 の詳細な核内分布を検討したところ、TDP-43 は核質での分布に加え、スプライソーム構成因子 snRNP (small nuclear ribonucleoprotein)の構成に重要な SMN (Survival of Motor Neuron)蛋白質が集積する核内小体 Gem、スプライシング制御因子の集積する核スペックル、long mRNA の集積するパラスペックルに強く集積することが判明した(図 7 A)。さらに、TDP-43 は Gem において、ALS 病因タンパク質の FUS、小児運動神

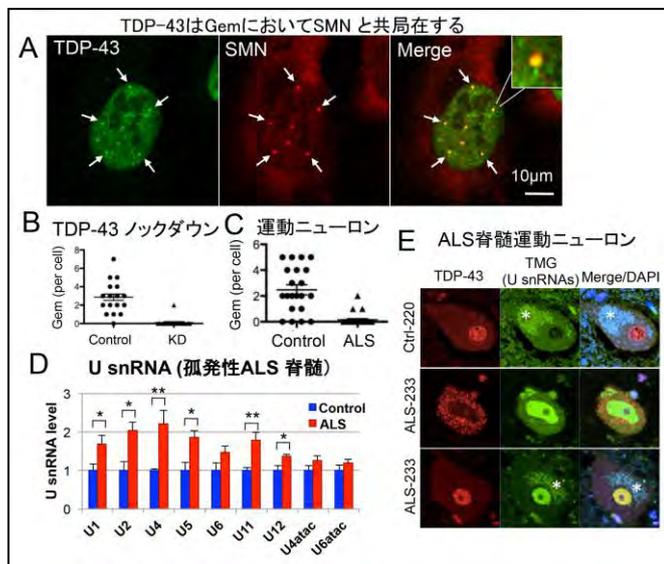


図 7 (A)TDP-43(緑)とSMN(赤)は核内小体 Gem において共局在する。(B) 培養神経細胞における TDP-43 ノックダウン、(C)ALS 運動神経における Gem の減少。(D)孤発性 ALS 脊髄における UsnRNA の蓄積(定量 PCR による検討)。(E)ALS 脊髄運動神経核における UsnRNA の異常蓄積(中、下段)。TDP-43 (赤)、UsnRNA を認識する抗体染色(緑)。

経変性疾患である脊髄性筋萎縮症(SMA)の原因タンパク質 SMN と複合体を形成していることを見いだしたため、Gem に焦点をあてて解析を行った。TDP-43 や FUS を欠失した細胞では Gem が消失し(図 7B)、TDP-43 の異常がみられる孤発性 ALS の運動神経においても Gem の減少が認められた(図 7C)。培養細胞において、TDP-43 の発現抑制により Gem が消失することから、スプライシング関連の変化が観察されるか検討したところ、スプライソソームの RNA 成分である snRNA (small nuclear RNA)の発現異常が起こることが判明した(図 7D)。さらに、孤発性 ALS 凍結脊髄においても広範な snRNA の発現異常が認められ、免疫組織学的検討では、ALS の運動神経核に著明な snRNA や snRNP の異常蓄積を認めた(図 7E)。Gem が消失することからスプライソソームにこれらの構成成分が集合できずに、non-functional な状態で核内に蓄積している可能性が考えられた。(Tsuiji et al. *EMBO Mol Med* 2013; 祖父江グループとの共同研究)

成果の位置づけ・類似研究との比較:スプライソソームの機能破綻は、SMA の主要な病態仮説であることと、ALS 病態においてもスプライソソームの破綻を見いだした本研究結果からは、運動神経細胞はスプライソソーム異常に脆弱であることや、運動神経変性に共通した機序としてスプライソソームの異常が関与していることが考えられた。本研究と同時期に国内外から類似した研究が報告され(Yamazaki et al. *Cell Rep*, 2012; Groen et al. *Hum Mol Genet*, 2013; Ishihara et al. *Hum Mol Genet*, 2013)、本学説の国際的な注目度の高さを示している。

2. TDP-43変異による ALS の病態解明

研究実施内容: ALS の一部は TDP-43 の変異により遺伝性に発症し、変異体に特徴的な異常を同定することは同タンパク質が異常蓄積する孤発性 ALS の病態解明に寄与すると考えられる。そこで、19 種類の TDP-43 変異による ALS の臨床データと変異タンパク質の生化学的特徴の相関を検討した。家族性 ALS 由来の TDP-43 の変異タンパク質の細胞内半減期が延長し($t=1/2$, WT: 12 hour, mutant 16-50 hour)、さらに半減期の長い変異を有する患者の平均発症年齢が早くなり、両者の間には負の相関が認め

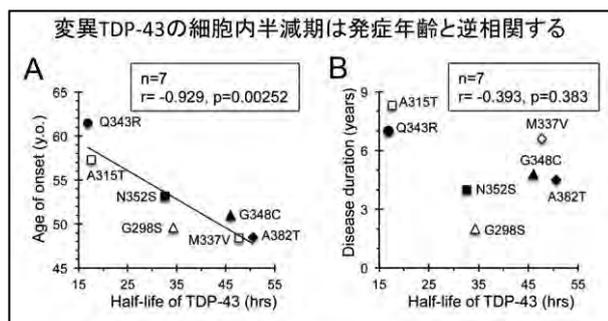


図 8 変異 TDP-43 の細胞内半減期と発症年齢には負の相関がある。発症年齢(A)、罹病期間(B)と疾患由来 TDP-43 変異タンパク質の細胞内半減期の相関。

られた(図 8A)。ところが、細胞内半減期と罹病期間は相関しなかった(図 8B)。また、変異タンパク質の細胞内局在、界面活性剤に対する可溶性についても網羅的検討を行ったが、発症年齢や罹病期間との相関はみられなかった。したがって、変異 TDP-43 タンパク質の細胞内半減期の延長が、ALS の病態解明の鍵になる生化学的特性であることが示唆された。これらの知見をもとに、薬剤添加によって野生型 TDP-43 蛋白の細胞内半減期を延長させ、細胞毒性と ALS 病巣で見られるような TDP-43 の蛋白切断や不溶化が再現できる細胞モデルを構築した。野生型 TDP-43 を誘導的に蓄積させることにより、TDP-43 が本来有する自己 mRNA 制御能が低下し、細胞毒性を惹起した。本研究により、TDP-43 タンパク質の安定化が新たな ALS の発症規定因子であることが明らかとなり、家族性 ALS にみられる TDP-43 変異は、細胞内半減期を延長、mRNA 制御能を低下させ、TDP-43 タンパク質の発現レベルのセットポイントを慢性的に上昇させる悪循環を来すことで gain of toxicity(異常タンパク質の蓄積)と loss of function (RNA 制御機構の喪失)の複合メカニズムによって神経変性を惹起することが考えられた。(Watanabe et al. *J Biol Chem* 2013)

成果の位置づけ・類似研究との比較: TDP-43 タンパク質の生化学的特徴に関する研究論文はこれまでに 100 報以上の報告があるが、本研究成果は、TDP-43 変異の生化学的特徴と、臨床データの相関に関して世界で初めて明らかにしたもので、病態メカニズムを解明するうえで

非常に重要な情報を提供している。

3. TDP-43タンパク質凝集体形成メカニズムの解明

研究実施内容: TDP-43 タンパク質凝集体の形成メカニズムを解明する目的で、試験管内で変性させた TDP-43 タンパク質を培養細胞内に少量導入したところ、細胞質に界面活性剤に不溶で、ALS 病巣と生化学的性質が似た TDP-43 タンパク質の異常凝集体の形成が加速することを見いだした。つまり、ALS 病巣で見られる TDP-43 の異常蓄積は少量の凝集体が”seed“として存在すると、その凝集過程が加速するという”seeding-reaction”によって起こり、凝集体のコアはタンパク質の C 末端であることを見いだした。この”seeding-reaction”は、アルツハイマー病におけるアミロイド β の凝集過程と共通した、神経変性疾患の異常タンパク質凝集に共通したメカニズムである。(Furukawa et al. *J Biol Chem* 2011)

成果の位置づけ・類似研究との比較: アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病など神経変性疾患の病巣では、病因タンパク質の異常凝集がみられ、その機序の解明は、病態メカニズム解明に非常に重要である。孤発性 ALS の病巣において凝集する TDP-43 タンパク質の凝集メカニズムに関する研究は、端緒についたところであるが、ホットトピックである。本研究は、TDP-43 の凝集時に seeding-reaction が関与していることを世界で最初に示した報告である。

(3) ALS におけるグリア関連病態の解明と標的分子の探索・同定

遺伝性 ALS モデルマウスを用いた一連の解析から、グリア細胞(ミクログリア、アストロサイト)における病的変化は ALS の疾患進行を加速することを見いだした。この結果に立脚して、孤発性 ALS におけるグリア関連病態の解明と疾患進行を制御する標的分子の探索を行った。

1. ALS マウス、患者病巣における遺伝子発現の網羅的解析

研究実施内容: ALS におけるグリア関連病態の解明と疾患進行を制御する標的分子の探索を目指し、cDNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。遺伝性 ALS マウス(変異 SOD1 マウス) 脊髄では 225 遺伝子、孤発性 ALS 患者脊髄では 173 遺伝子の発現異常を明らかにした。細胞群別の遺伝子発現プロファイルを得るために、マウス初代培養細胞から細胞群別トランスクリプトーム(神経細胞、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)を樹立して、得られた遺伝子がどの細胞群により発現しているかを予測した。ヒト遺伝子のトランスクリプトーム解析には、マウス相同遺伝子を用いた。中枢神経系の細胞群別トランスクリプトーム解析により、同定した遺伝子の約 50% (83 遺伝子) がグリア細胞であるミクログリアとアストロサイトに多く発現する遺伝子であると考えられた。細胞群別トランスクリプトーム解析の妥当性は、抗体を用いた免疫組織染色において確認した。さらに、グリア細胞病態が、遺伝性 ALS モデルマウスとヒト孤発性 ALS 患者組織に共通しているかどうかを検討した。同定遺伝子の比較検討により、孤発性 ALS 病巣のグリア細胞において異常発現する遺伝子の約半数(42 遺伝子)は、変異 SOD1 マウスにおいても発現異常がみられた。(図 9)(祖父江グループとの共同研究)

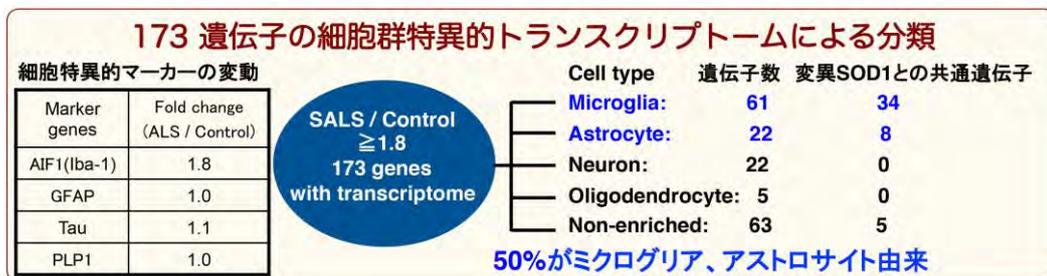


図 9. 細胞群特異的トランスクリプトームを用いた孤発性 ALS 脊髄の網羅的遺伝子発現解析。約 50%の遺伝子がミクログリア、アストロサイトに高い発現を示す遺伝子であり、そのうち約 30-50%は遺伝性ALSモデルマウス(変異 SOD1 マウス)と共通して発現異常を示した。

2. ALSにおける自然免疫経路の役割

研究実施内容: 候補遺伝子的アプローチとして、ALSモデルにおける自然免疫経路の役割を解析した。1. で行った網羅的遺伝子発現解析により、Toll-like 受容体 (TLR) など自然免疫経路に関連した遺伝子の発現亢進が認められた。そこで、ALSモデルに対するTLR依存性の自然免疫経路の関与を検討するため、TLRからのシグナル伝達に必須であるアダプター蛋白 MyD88、TRIF のノックアウトマウスと SOD1^{G93A} マウスの3重

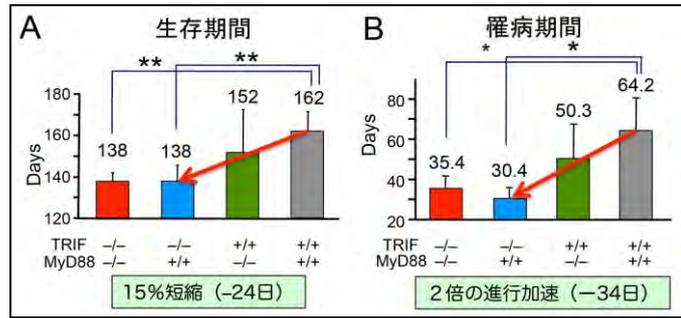


図 10 SOD1^{G93A} (灰色)、SOD1G93A/MyD88-KO (緑)、SOD1^{G93A}/TRIF-KO (赤)、SOD1G93A/TRIFKO/MyD88KO (赤) マウスの生存期間 (A)、罹病期間。(B) *: p<0.05, **: p<0.01

交配実験を行った。MyD88 欠失による生存期間への影響はみられなかったが、TRIF を欠失した変異 SOD1 マウスでは罹病期間が 50%短縮 (34 日短縮) し、疾患進行の著しい加速 (約 2 倍) と生存期間の約 15%の短縮がみられた (生存期間、SOD1^{G93A}: 162 日, SOD1^{G93A}/TRIF^{-/-}: 138 日) (図 10)。

3. ALSにおけるTGF-βの関与

研究実施内容: Transforming growth factor-β1(TGF-β1)は、多面的な機能を有する増殖因子、炎症抑制性サイトカインであり、孤発性 ALS の血清および脳脊髄液において上昇が認められ、またそのシグナル経路異常が孤発性 ALS の病態に関与することが示唆されている。近年、末梢マクロファージと同様、神経系のミクログリアにおいても、細胞傷害性(M1 ミクログリア)と組織保護性(M2 ミクログリア)の二面的な活性化状態があるという学説があり、ミクログリアを M2 に誘導することにより、神経保護作用が期待できるという報告がある。そこで、M2 ミクログリアへの誘導因子の一つと考えられている Transforming growth factor-β1(TGF-β1)の ALS モデルマウスにおけるグリア細胞応答への関与について検討を行った。

変異 SOD1 マウス脊髄では、アストロサイトにおいて内在性 TGF-β1 の発現が上昇していた。ALS の病態における TGF-β1 の役割を解明するため、アストロサイト特異的に TGF-β1 を過剰発現する ALS マウス(SOD1^{G93A}/GFAP-TGF-β1 マウス)を作成したところ、発症時期は変化せず、疾患進行が加速して平均寿命が短縮した (図 11A)。また、ALS マウスの脊髄における内在性 TGF-β1 の mRNA 発現量は、生存期間と逆相関していた (図 C)。そこで、SOD1^{G93A}/TGF-β1 マウスのミクログリアの活性化状態について定量的 PCR による遺伝子発現解析を行ったところ、M1 ミクログリアのマーカーと M2 ミクログリアのマーカーの発現に有意な差は認められなかった。しかし、免疫組織化学法による検討で、ミクログリアの活性自体が低下しており、それに伴い、M2 ミクログリア由来と考えられる神経保護性因子 IGF-1 の発現が減少していることが判明した (図 11B)。TGF-β1 は免疫系においてリンパ球の増殖や分化を制御することから、ALS マウスの脊髄浸潤 T リンパ球の性状を検討したところ、脊髄浸潤 T リンパ球の減少と IFN-γ/IL-4 産生 T リンパ球数比の増加が見られた。以上から、予想に反して TGF-β1 はミクログリア、T リンパ球による神経保護環境を負に制御する因子であることが考えられた (図 11C)。(投稿中)

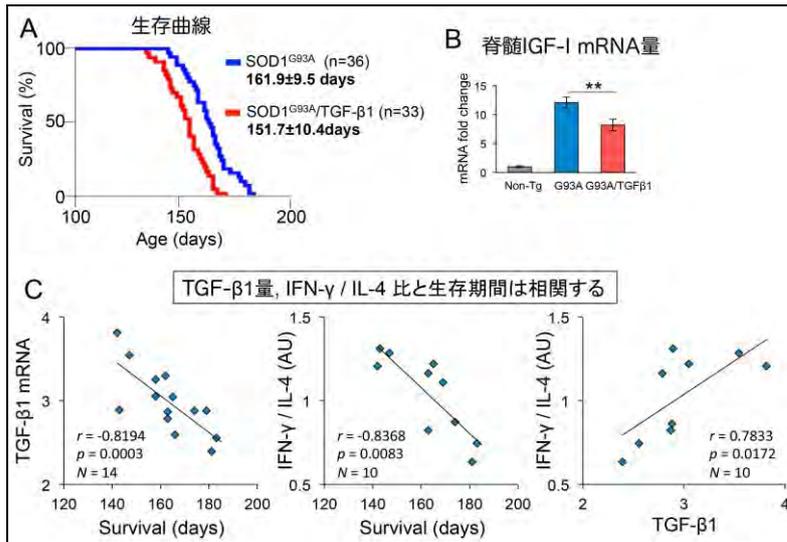


図 11 アストロサイト由来の TGF-β は ALS マウスにおける神経保護機能を負に制御する因子である。(A) SOD1^{G93A}, SOD1^{G93A}/TGF-β マウスの生存曲線, (B) TGF-β 発現による脊髄 IGF-1 mRNA 量の減少, (C) 脊髄内在性 TGF-β 量, IFN-γ/IL-4 比, マウス生存期間は相関する。

4. ALS マウスにおけるシュワン細胞の役割について

研究実施内容: 末梢神経のミエリン鞘の構成に重要なグリア細胞であるシュワン細胞の ALS への関与を検討した。ALS における運動ニューロン変性を再現し、細胞群特異的に変異 SOD1 遺伝子を除去可能な *LoxSOD1^{G37R}* マウスとシュワン細胞に特異的に Cre タンパクを発現する *P0-Cre* マウスを交配した。シュワン細胞において変異 SOD1 (酵素活性を有する) を除去すると疾患進行はより加速し、それはシュワン細胞における神経栄養因子 IGF-1 の産生低下を伴っていた。この実験から、シュワン細胞においては変異 SOD1 による毒性よりも、活性型 SOD1 による活性酸素の除去が運動神経に保護的であることが示唆され、シュワン細胞も ALS 疾患進行に関与することが明らかとなった (Lobsiger et al. *PNAS* 2009)。

成果の位置づけ・類似研究との比較: 神経変性疾患の病態において、神経細胞だけではなく、周囲のグリア細胞の異常が積極的に関与するという「非自律性」の神経変性メカニズムは、山中らがそのコンセプトの確立に貢献し、ALS の病態抑止療法の開発につながる学説である。神経変性疾患におけるグリア細胞病態に関する研究は、論文数も増加しアクティブな研究領域であり、本グループによる研究成果も貢献している。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、遺伝性 ALS モデルである変異 SOD1 マウスにおけるグリア関連病態の解析は、孤発性 ALS のグリア病態解明にも応用できることを示唆している。また、ALS に関する候補遺伝子アプローチとして検討した自然免疫経路は、アルツハイマー病などでも異常タンパク質の認識機構としてその関与が示されている。本研究成果による、TRIF 依存性自然免疫経路が、ALS の神経変性の進行に関与していることから、このパスウェイの制御が治療法開発に向けたシーズになる可能性がある。抑制性サイトカイン TGF-β1 は、孤発性 ALS の血清、脳脊髄液での増加が見られることや、動物モデルにおける検討から、発現量と生存期間との相関がみられることから、病態バイオマーカーとして検証していくことが重要である。また、運動神経保護的な作用を有すると考えられている TGF-β シグナル経路は、グリア細胞においては異なる作用を呈することが本研究で明らかとなったことから、細胞群特異的な TGF-β シグナル経路の制御法の樹立が治療法開発にむけて必要であると考えられる。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 33件)

1. Nishimoto Y, Yamashita T (contributed equally with YN), Hideyama T, Tsuji S, Suzuki N, Kwak S. Determination of editors of mRNAs with site-selective A-to-I editing positions, *Neurosci Res* 61: 201-206, 2008. (DOI: 10.1016/j.neures.2008.02.009)
2. Iwata NK, Aoki S, Okabe S, Arai N, Terao Y, Kwak S, Abe O, Kanazawa I, Tsuji S, Ugawa Y: Evaluation of corticospinal tracts in ALS with diffusion tensor MRI and brainstem stimulation. *Neurology* 70: 528-32, 2008. (DOI: 10.1212/01.wnl.0000299186.72374.19)
3. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 Depletion Induces Neuronal Cell Damage through Dysregulation of Rho Family GTPases. *J Biol Chem*. 284: 22059-22066, 2009. (DOI: 10.1074/jbc.M109.012195)
4. Palazzolo I, Stack C, Kong L, Musaro A, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Taylor JP, Sumner CJ, Fischbeck KH, Pennuto M. Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 63: 316-328, 2009. (DOI: 10.1016/j.neuron.2009.07.019)
5. Sawada J, Yamashita T (contributed equally with JS), Aizawa H, Aburakawa Y, Hasebe N, Kwak S. Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site-RNA editing in a modified HeLa cell line. *Neurosci Res* 64: 251-258, 2009. (DOI: 10.1016/j.neures.2009.03.009)
6. Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci, USA* 106: 4465-4470, 2009. (DOI: 10.1073/pnas.0813339106)
7. Sone J, Niwa JI, Kawai K, Ishigaki S, Yamada SI, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 88: 123-135, 2010. (DOI: 10.1002/jnr.22175)
8. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S. Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* 30: 11917-11925, 2010. (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2021-10.2010)
9. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, Kwak S. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* 120: 75-84, 2010. (DOI: 10.1007/s00401-010-0678-x)
10. Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Tsunoda T, Oshima S, Sano M, Kamei T, Tokuda T, Aoki M, Hasegawa K, Mizoguchi K, Morita M, Takahashi Y, Katsuno M, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Kaji R, Nakano I, Kamatani N, Tsuji S, Sobue G, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 20: 3684-3692, 2011. (DOI: 0.1093/hmg/ddr268)
11. Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, Nukina N. A seeding reaction recapitulates intracellular formation of sarkosyl-insoluble TAR DNA binding protein-43 inclusions. *J Biol Chem* 286: 18664-72, 2011. (DOI: 10.1074/jbc.M111.231209)
12. Takeuchi H, Mizoguchi H, Doi Y, Jin S, Noda M, Liang J, Li H, Zhou Y, Mori R, Yasuoka S, Li E, Parajuli B, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Sato J, Yamanaka K, Sobue G, Mizuno T, Suzumura A. Blockade of Gap Junction Hemichannel Suppresses Disease Progression in Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Alzheimer's Disease. *PLoS One* 6 e21108, 2011. (DOI:10.1371/journal.pone.0021108)
13. Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J-I, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis*. 45: 862-870, 2012. (DOI: 10.1016/j.nbd.2011.12.002)
14. Ishigaki S, Masuda A, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K. Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and

- transcriptions. *Sci Rep.* 2:529, 2012. (DOI: 10.1038/srep00529)
15. Katsumata R, Ishigaki S, Katsuno M, Kawai K, Sone J, Huang Z, Adachi H, Tanaka F, Urano F, Sobue G. c-Abl inhibition delays motor neuron degeneration in the G93A mouse, an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7: e46185, 2012. (DOI: 10.1371/journal.pone.0046185)
 16. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by expanded polyglutamine. *Nat Med.* 18: 1531-1538, 2012. (DOI: 10.1038/nm.2932)
 17. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G: Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med.* 18: 1136-1141, 2012. (DOI: 10.1038/nm.2791)
 18. Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido TC, and Kwak S. A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat Commun* 3: 1307, 2012. (DOI: 10.1038/ncomms2303)
 19. Hideyama T, Teramoto S, Hachiga K, Yamashita T, Kwak S. Co-occurrence of TDP-43 mislocalization with reduced RNA editing enzyme, ADAR2, in aged mouse motor neurons: implications for age-related acceleration of ALS. *PLoS One* 7(8): e43469, 2012. (DOI: 10.1371/journal.pone.0043469)
 20. Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, Kwak S. Abnormal processing of TDP-43 does not regulate ADAR2 activity in cultured cell lines. *Neurosci Res* 73 153-160. 2012. (DOI:)
 21. Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T, Kwak S. RNA editing of the Q/R site of GluA2 in different cultured cell lines that constitutively express different levels of RNA editing enzyme ADAR2. *Neurosci Res* 73: 42-48, 2012. (DOI: 10.1016/j.neures.2012.02.015)
 22. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, Kwak S. Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis* 45: 1121-28, 2012. (DOI: 10.1016/j.nbd.2011.12.033)
 23. Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One* 8: e54511, 2013. (DOI: 10.1371/journal.pone.0054511)
 24. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain* 136: 1371-1382, 2013. (DOI: 10.1093/brain/awt029)
 25. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. *Sci Rep.* 3: 2388, 2013. (DOI: 10.1038/srep02388)
 26. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun.* 4:1405, 2013. (DOI: 10.1038/ncomms2417)
 27. Takagi S, Iguchi Y, Katsuno M, Ishigaki S, Ikenaka K, Fujioka Y, Honda D, Niwa J, Tanaka F, Watanabe H, Adachi H, Sobue G. RNP2 of RNA Recognition Motif 1 Plays a Central Role in the Aberrant Modification of TDP-43. *PLoS One* 8: e66966, 2013. (DOI: 10.1371/journal.pone.0066966)
 28. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, Kwak S. Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med* 5, 1710-19, 2013. (DOI: 10.1002/emmm.201302935)
 29. Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K. Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked TDP-43 mutations. *J Biol Chem* 3641-3654, 2013. (DOI: 10.1074/jbc.M112.433615)

30. Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome Integrity is defective in Motor Neuron Diseases, ALS and SMA. *EMBO Mol Med* 5, 221-234, 2013. (DOI: 10.1002/emmm.201202303)
31. Honda D, Ishigaki S, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. *FEBS Open Bio* 4, 1-10, 2013. (DOI: 10.1016/j.fob.2013.11.001)
32. Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G. Lower Motor Neuron Involvement in TAR DNA-Binding Protein of 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* 71, 172-179, 2014. (DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.5489)
33. Austin JA, Wright GSA, Watanabe S, Grossmann JG, Antonyuk SV, Yamanaka K, Hasnain SS. Aggregation resistant TDP-43 RRM domain disease mutants have increased stability and half-life. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 4309-4314, 2014. (DOI: 10.1073/pnas.1317317111)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

①査読審査の入る proceedings 等

1. Kwak S, Nishimoto Y, Yamashita T. Newly identified ADAR2-mediated editing positions as a useful tool for ALS research. *RNA Biology* 5: 193-197, 2008.
2. Buckingham SD, Kwak S, Jones AK, Blackshaw SE, Sattelle DB: Edited GluR2, a gatekeeper for motor neuron survival? *BioEssays* 30: 1185-1192, 2008. (DOI: 10.1002/bies.20836)
3. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T. AMPA receptor-mediated neuronal death in motor neuron diseases. In: Amino Acid Receptor Research, Eds. Paley BF, Warfield TE, Nova Science Publishers Inc. NY. pp 293-310, 2008.
4. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H. AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 30: 182-188, 2010. (DOI: 10.1111/j.1440-1789.2009.01090.x)
5. Hideyama T, Yamashita T, Nishimoto Y, Suzuki T, Kwak S: Novel etiologic and therapeutic strategies for neurodegenerative diseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci* 113: 9-13, 2010.
6. Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Transforming growth factor-beta signaling in motor neuron diseases. *Current Mol Med*. 11: 48-56, 2011.
7. Hideyama T, Kwak S. When does ALS start? ADAR2-GluA2 hypothesis for the etiology of sporadic ALS. *Front Mol Neurosci* 4: 33, 2011. (DOI: 10.3389/fnmol.2011.00033)
8. Lasiene J, Yamanaka K. Glial cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Res Int* 2011, 718987, 2011. (DOI:10.1155/2011/718987)
9. Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 329-335, 2012. (DOI: 10.1136/jnnp-2011-301307)
10. Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci*. 13: 1225-1238, 2012. (DOI: 10.3390/ijms1301122)
11. Iguchi Y, Katsuno M, Ikenaka K, Ishigaki S, Sobue G. Amyotrophic lateral sclerosis: an update on recent genetic insights. *J Neurol*. [Epub ahead of print]
12. Al-Chalabi A, Kwak S, Mehler M, Rouleau G, Siddique T, Strong M, Leigh PN: Genetic and epigenetic studies of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14 (Supple 1): 44-52, 2013. (DOI: 10.3109/21678421.2013.778571)
13. Yamashita T, Kwak S. The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* in press. (DOI:org/10.1016/j.brainres.2013.12.011)

②その他

1. 田中章景, 坂野晴彦, 井口洋平, 勝野雅央, 祖父江 元. 運動ニューロン疾患の治療の進歩. *神経治療* 26: 471-475, 2009.
2. 勝野雅央, 坂野晴彦, 鈴木啓介, 足立弘明, 田中章景, 祖父江 元. 運動ニューロン疾患の病因解析と治療法の開発. *細胞工学* 28: 456-460, 2009.
3. 山中宏二. 筋萎縮性側索硬化症とグリア細胞. *Medical Science Digest* 39, 262-263, 2009.
4. 山中宏二. ALS の今後の研究方向と可能性は. *MB Medical Rehabilitation* 113, 13-18, 2009.
5. 田中章景, 井口洋平, 熱田直樹, 勝野雅央, 祖父江 元. 運動ニューロン疾患の治療の進歩. *神経治療学* 27: 521-524, 2010.
6. 山中宏二. 神経変性疾患における細胞死研究のパラダイムシフト. 実験医学増刊「細胞死研究総集編」羊土社, p212-218, 2010.
7. 山中宏二, 遠藤史人. ALS の病態—非細胞自律性の神経細胞死. *医学のあゆみ* 235, 241-245, 2010.
8. 田中章景, 井口洋平, 石垣診祐, 勝野雅央, 祖父江 元. 運動ニューロン疾患の治療の進歩. *神経治療学* 28: 367-369, 2011.
9. 祖父江 元, 勝野雅央, 坂野晴彦, 鈴木啓介, 田中章景, 祖父江 元. 神経疾患研究の現状と課題. *学術の動向* 16: 52-56, 2011
10. 山下博史, 山中宏二. ALS-SOD1 の発症機序. *Clinical Neuroscience* 29, 1044-1045, 2011.
11. 田中章景, 井口洋平, 池中健介, 石垣診祐, 勝野雅央, 祖父江 元. 運動ニューロン疾患の治療の進歩. *神経治療学* 29: 401-403, 2012.
12. 井口洋平, 勝野雅央, 祖父江 元: 孤発性 ALS の分子標的治療への展望. *Bio Clinica* 27: 941-945, 2012.
13. 井口 洋平, 祖父江 元. 筋萎縮性側索硬化症のバイオマーカー研究. *実験医学* 30: 2568-2571, 2012.
14. 山下博史, 山中宏二: ALS 病態におけるグリアの役割. *脳* 21 15, 28-33, 2012.
15. 山中宏二: 脳・脊髄環境の恒常性維持と神経疾患. *実験医学別冊* 「臓器円環による生体恒常性のダイナミクス」羊土社, p111-115, 2013.
16. 山中宏二, 小峯 起. グリア関連病態. 「すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患」中山書店, p233-238, 2013.
17. 築地仁美, 山中宏二. ALS と脊髄内環境変化. *Medical Science Digest* 39, 211-214, 2013.
18. 山中宏二. 神経変性疾患におけるミクログリア. *医学のあゆみ* 246, 961-965, 2013.
19. Hitomi Tsujii, Koji Yamanaka. Animal Models for Neurodegenerative Disorders. In: Verma A, Singh, A, editors. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, Elsevier, pp39-56, 2014.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 46 件、国際会議 19 件)

国内会議

1. 祖父江 元. 神経変性疾患の病態解明と治療への展望, 秋田大学工学資源学部特別講演. 秋田 2008.10.10
2. 郭 伸. 「TDP43 異常と運動ニューロン死を結ぶ分子異常」シンポジウム S3 前頭側頭葉変性症 (FTLD) と ALS における TDP-43 をめぐる最近の話題. 第 27 回日本認知症学会. 前橋 2008.10.10-11
3. 祖父江 元. 孤発性 ALS のモデル動物作成を通じた分子標的治療開発 (独)科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業(CREST) 「精神・神経の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」研究領域第 1 回領域シンポジウム. 東京 2008.11.28.
4. 郭 伸. ALS の臨床と研究の現状. 平成 20 年度日本神経学会関東地区生涯教育講演会. 東京 2008. 11.30.
5. 日出山拓人, 鈴木岳之, 郭 伸. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における RNA 編集酵素異常 (RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis). シンポ

ジウム「システムとしての神経疾患—病因解明と治療への新たな戦略」第 82 回薬理学会年会. 横浜 2009. 3. 16-18.

6. 祖父江 元. トランスレーショナルリサーチの今後の発展. 第 50 回日本神経学会総会, 50 周年記念シンポジウム. 仙台 2009.5.18
7. 田中章景, 和座雅浩, 祖父江 元. 孤発性 ALS 疾患モデルによる病態解明と治療法開発. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台 2009.5.20-22.
8. 郭 伸. 興奮性神経細胞死から見た ALS ALS シンポジウム. 第 50 回日本神経病理学会. 高松 2009.6.4-6.
9. 祖父江 元. 神経変性疾患の分子標的治療への展望. 日本神経学会第 91 回近畿地方会 ランチョンセミナー 大阪 2009.6.20.
10. 郭 伸. ALS における RNA editing, シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」第 52 回日本神経化学会. 伊香保, 2009.6.22-24.
11. 郭 伸, 日出山拓人, 山下雄也, 鈴木岳之. 発症機構から導き出された神経疾患の薬物治療への新たな可能性 シンポジウム「生体機能と創薬シンポジウム」. 日本薬学会, 東京, 昭和大学上条講堂, 2009.8.26-27
12. 郭 伸. 「ALS 治療標的としての興奮性細胞死. Excitotoxicity, old but new vistas to ALS therapy」シンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開, Molecular targeted therapy for neurodegenerative disease – new progress」第 32 回日本神経科学大会. 名古屋 2009.9.13-18
13. 祖父江 元, 郭 伸, 山中宏二. 孤発性 ALS のモデル動物作成を通じた分子標的治療開発. CREST 「精神・神経」領域全体会, 東京. 2009.12.22
14. 祖父江 元, 郭 伸, 山中宏二. 孤発性 ALS のモデル動物作成を通じた分子標的治療開発. CREST 第 2 回公開シンポジウム, 東京. 2010.2.23
15. 祖父江 元. 神経変性疾患の分子標的治療への展開, 第 47 回日本臨床分子医学会学術集会 特別講演 I. 東京 2010.4.10
16. 郭 伸. AMPA 受容体サブユニットの RNA editing 異常と孤発性 ALS 第一回宮崎先端医学セミナー「グルタミン酸受容体の基礎と臨床」宮崎 2010.4.23
17. 祖父江 元. 第 51 回日本神経学会総会シンポジウム Academia-based development of disease-modifying therapy (アカデミア発の創薬・治療研究) 2010.5.21
18. 郭 伸. Inefficient A-to-I RNA editing and ALS/ALS における RNA editing 異常の病因的意義, シンポジウム: Neurodegenerative diseases and RNA/神経疾患と RNA. 第 51 回日本神経学会総会 東京 2010.5.22
19. 日出山拓人, 山下雄也, 鈴木岳之, Higuchi Miyoko, Seeburg H Peter, 高橋良輔, 辻省次, 三澤日出巳, 郭 伸. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における RNA 編集酵素異常. RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. シンポジウム「若手研究者が展開する筋萎縮性側索硬化症研究の将来展望」. 第 33 回日本神経科学大会. 神戸 2010. 9.2-4
20. 山中宏二. 筋萎縮症側索硬化症と封入体. 第 99 回日本病理学会総会 ワークショップ「神経変性疾患と封入体」, 東京, 2010. 4.29.
21. 山中宏二. Protein degradation in neurodegenerative diseases. 第 87 回日本生理学会 シンポジウム「蛋白質分解と神経伝達・神経疾患」, 盛岡, 2010. 5. 19.
22. 日出山拓人, 郭 伸. Absence of GluR2 RNA editing induces slow death of motor neurons in conditional ADAR2 knockout mice. The perspectives of motor neuron disease research. 理化学研究所 2010. 8. 30.
23. 山中宏二. The role of glial cells in ALS. Neuro 2010 シンポジウム「若手研究者が展開する筋萎縮性側索硬化症研究の将来展望」, 神戸, 2010. 9. 2.
24. 山中宏二. 神経変性疾患における非細胞自律性の神経細胞死, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会, 第 83 回日本生化学会大会合同大会) ワークショップ「死細胞による生体の恒常性維持とその破綻」, 神戸, 2010. 12. 9.

25. 郭 伸. Failure of RNA editing and the pathogenesis of ALS. AAN-JSN Joint Symposium (ALS セッション) 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋 2011.5.18-20
26. 田中章景, 池中建介, 祖父江 元. Dynactin-1 を標的とした孤発性 ALS モデルの開発, シンポジウム「運動ニューロン疾患の分子病態の解明と治療法開発への展望」第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋 2011.5.18-20.
27. 祖父江 元. ALS の神経病理とオミックス 第52回日本神経病理学会総会学術研究会シンポジウム「オミックスサイエンスの展開と神経病理学」 京都 2011.6.4.
28. 山中宏二. ALS におけるグリア関連病態. 第52回日本神経学会学術大会シンポジウム, 名古屋, 2011.5.20.
29. 山中宏二. ALS におけるグリア病態: 治療標的としての可能性. 第1回京滋神経内科研究フォーラム特別講演, 京都, 2011. 6. 4.
30. 山中宏二. Active roles of glial cells in non-cell autonomous neurodegeneration in ALS. 第34回日本神経科学大会シンポジウム, 横浜, 2011.9.15.
31. 山中宏二. 神経変性疾患におけるグリア病態. 第20回パーキンソン病研究会, 東京, 2011.9.17.
32. 田中章景, 祖父江 元. 神経変性疾患の病態抑止治療への展望. 第6回臨床ストレス応答学会大会. 名古屋 2011.11.15-16.
33. 祖父江 元. 運動ニューロン病研究の進歩と治療への展望. 第109回日本内科学会講演会, 京都, 2012.4.14.
34. 山中宏二. 神経変性疾患 ALS におけるグリア病態. 第85回日本薬理学会年会シンポジウム, 京都, 2012. 3.15.
35. 郭 伸. 孤発性 ALS における ADAR2-GluA2 仮説. 都医学研セミナー 東京都医学総合研究所. 東京 2012. 3. 19.
36. 山中宏二. Non-autonomous cell death は、神経変性疾患の共通機構か? 第53回日本神経学会学術大会, 東京, (2012. 5. 24.) シンポジウム講演
37. 郭 伸. ALS 遺伝子治療の展望 - 経血管的 ADAR2 遺伝子の導入. 厚生労働科学研究費 難治性疾患克服事業 神経変性疾患に関する研究班夏のワークショップ. 東京 2012. 7. 20.
38. 山中宏二. ALS における“Non-cell autonomous”の神経変性機序の確立とその展開. 第3回 ALS フォーラム, 東京 (2012. 7.28) 基調講演
39. 山中宏二. 神経変性疾患 ALS におけるグリア・免疫関連. 第14回応用薬理シンポジウム, 甲府, 2012.9.4. シンポジウム講演
40. 山中宏二. The roles of microglia and immune system in neurodegeneration of ALS. Neuro2012, 名古屋, 2012. 9.18. シンポジウム講演
41. 祖父江 元. 神経変性疾患の病体抑止治療を目指して. 第35回日本神経科学大会特別講演, 名古屋, 2012.9.20.
42. 山中宏二. 神経変性疾患 ALS におけるグリア・免疫関連. 埼玉大学脳融合研究センターシンポジウム, さいたま (2012.10.6) シンポジウム講演
43. 山中宏二. 神経変性疾患 ALS におけるグリア・免疫関連. 第1回神経と免疫を語る会, 大阪, 2013.3.16. 招待講演
44. 郭 伸. ALS を知る: 分子病態から臨床像を理解し治療法を探る」第8回北海道神経リハビリテーション治療フォーラム, 札幌グランドホテル. 札幌 2013. 4. 19.
45. 郭 伸. ここまで分かった ALS の病因とその治療」第11回東京脳・神経セミナー、帝京大学. 東京 2013. 5. 27.
46. 山中宏二. Infiltrating immune cells-glia communication in neurodegenerative disease. Neuro2013, 京都, 2013. 6. 20. シンポジウム講演

国際会議

1. Kwak S. A-to-I RNA editing of GluR2 and ALS. Trinity Term 2008 Departmental Seminar. Department of Physiology, Anatomy and Genetics, Oxford Univ., Oxford, UK, 2008.11.7.

2. Yamanaka K. ALS pathogenesis and Glial cells. 13th International Symposium at MNRC. Shiga, 2010.9.1.
3. Ishigaki S, Fujioka Y, Zhu LJ, Urano F, Sobue G. Analysis of FUS/TLS-deficient differentiated motor neurons. First BRI International Symposium 2010, Niigata, 2010.11.22-23.
4. Kwak S. Inefficient GluA2 RNA editing as a cause of slow death of motor neurons. Current understandings and future directions for ALS. First BRI International Symposium 2010, Niigata, 2010.11.22-23.
5. Yamanaka K. A role of glial cells in familial and sporadic ALS. First BRI International Symposium 2010, Niigata, Japan, 2010.11.22-23.
6. Yamanaka K. Active roles of glial cells in neurodegenerative disease. International Conference on Systems in Medicine and Biology (ICSMB 2010), Kharagpur, India, 2010.12.16-18.
7. Yamanaka K. Non Cell-Autonomous Neurodegeneration in Motor Neuron Disease. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyo, Tokyo, Japan, 2011.2.22.
8. Yamanaka K. The active role of glial cells in familial and sporadic motor neuron disease. CNS-JNS joint symposium, The 9th Biennial Conference of the Chinese Neuroscience Society, Zhengzhou, China, 2011.8.1.
9. Yamanaka K. Recent advances in motor neuron disease: from modeling disease in laboratory animals to understanding human neurodegenerative disease. Plenary Lecture, 2011 KALAS (Korea Association for Laboratory Animal Science) International Symposium, Muju, Korea, 2011.8.25.
10. Kwak S. Failure of RNA editing and ALS pathogenesis. ALS Conference. Tarry Town NY, 2011. 9.7-9.
11. Yamanaka K. Recent advances in motor neuron disease: from modeling disease in laboratory animals to understanding human neurodegenerative disease. Invited Lecture, 6th Biyani's International Conference-2011 on Innovations in the Latest Healthcare Issues, Jaipur, India, 2011.9.19.
12. Sobue G. Sporadic ALS: Search for pathogenesis and therapeutic approach. 20th World Congress of Neurology Marrakesh, Morocco, 2011.11.13.
13. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T. RNA editing and ALS. 6th International Symposium on Nanomedicine. Matsue, 2012. 4.19.
14. Ishigaki S, Fujioka Y, and Sobue G. FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ in neurons: a novel link between FUS and Tau in the pathogenesis of ALS and FTL. 6th International Symposium on Nanomedicine. Matsue, 2012. 11.30.
15. Yamanaka, K. Active roles of glial cells in SOD-linked familial and sporadic ALS. "Recent Scientific Advances in MND Research" Symposium, Liverpool, UK, 2012. 3. 6.
16. Iguchi Y. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. 8th Symposium André-Delambre, Quebec City, Canada, 2012.9.21-22.
17. Yamanaka K. The role of glia-immune communication in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2012 The Korean Society for Neurodegenerative Disease Symposium, Seoul, Korea, 2012.10.27.
18. Yamanaka K. Glial cells in experimental models of ALS: from a view of glia-immune communication. 3rd Venusberg meeting on Neuroinflammation, Bonn, Germany, 2013.3.2.
19. Kwak S. Calpain cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. Biology of Clpains in Health and Disease. Science Research Conferences FASEB, Saxtons River, Vermont, USA, 2013. 7. 21-26.

② 口頭発表 (国内会議 24 件、国際会議 7 件)
国内会議

1. 井口洋平, 勝野雅央, 丹羽淳一, 田中章景, 貝淵弘三, 祖父江 元. TDP-43による神経変性機序. loss of functionの検討. NAGOYAグローバルリトリート 愛知, 2009.2.20
2. 日出山拓人, 鈴木岳之, 郭 伸. シンポジウム「システムとしての神経疾患—病因解明と治療への新たな戦略」第82回薬理学会年会. 横浜, 2009.3.16-18
3. 井口洋平, 勝野雅央, 丹羽淳一, 曾根淳, 和座雅浩, 足立弘明, 田中章景, 貝淵弘三, 祖父江 元. TDP-43による神経細胞障害: loss of functionの検討. 第50回日本神経学会総会. 仙台, 2009.5.20-22
4. 日出山拓人, 山下雄也, 鈴木岳之, 辻省次, Higuchi M, Seeburg PH, 高橋良輔, 三澤日出巳, 郭 伸. 孤発性筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの開発と病態解析. 第50回日本神経学会総会. 仙台, 2009.5.20-22
5. 井口洋平, 勝野雅央, 丹羽淳一, 曾根淳, 和座雅浩, 足立弘明, 田中章景, 貝淵弘三, 祖父江 元. TDP-43による神経変性機序, 第32回日本神経科学大会. 名古屋, 2009.9.16-18
6. 池中建介, 蔣月梅, 田中章景, 勝又竜, 河合香里, 黄哲, 勝野雅央, 山本正彦, 祖父江 元. 神経変性疾患におけるdynactin-1と細胞周期関連分子の発現解析. 第51回日本神経学会総会. 東京, 2010.5.20-22
7. 井口洋平, 勝野雅央, 丹羽淳一, 高木伸之介, 足立弘明, 田中章景, 貝淵弘三, 祖父江 元. 神経細胞におけるTDP-43のloss-of-functionの検討. 第51回日本神経学会総会. 東京, 2010.5.20-22
8. 日出山拓人, 山下雄也, 相澤仁志, 柿田明美, 高橋均, 辻省次, 郭 伸. 孤発性筋萎縮性側索硬化症とRNA編集異常. 第51回日本神経学会総会. 東京, 2010.5.20-22.
9. 山下博史, 藤森典子, 片岡礼音, 井口洋平, 熱田直樹, 田中章景, 祖父江 元, 山中宏二. 細胞特異的トランスクリプトームを用いた孤発性ALS患者脊髄のDNAマイクロアレイによる解析. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011.5.18-20.
10. 石垣診祐, 藤岡祐介, 田中章景, 祖父江 元. 運動ニューロンにおけるALS関連変異FUS/TLSの機能障害. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011.5.18-20
11. 藤岡祐介, 石垣診祐, 祖父江 元. 分化運動ニューロンを用いたFUS/TLSノックダウンモデルの作成と機能解析. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011.5.18-20
12. 山下博史, 藤森典子, 片岡礼音, 井口洋平, 熱田直樹, 田中章景, 祖父江元, 山中宏二. 細胞特異的トランスクリプトームを用いた、孤発性 ALS 患者脊髄の DNA マイクロアレイによる解析. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011.5.18-20.
13. 山中宏二, 藤森典子, 山下博史. ALS における自然免疫経路の関与. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011.5.18-20.
14. Ishigaki S, Fujioka Y, Sobue G. Quality loss of FUS function is involved in the pathogenesis of ALS. 第 34 回日本神経科学大会. 横浜, 2011.9.14-17.
15. 築地仁美, 片岡礼音, 山中宏二. Regulation of spliceosome by ALS-causative gene TDP-43. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.14-17.
16. 池中建介, 河合香里, 蔣月梅, 黄哲, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江 元. dynactin-1 ノックダウン線虫を用いた孤発性 ALS (SALS) 軸索輸送障害モデルの作成. 第 54 回日本神経化学大会. 金沢, 2011.9.26.
17. 築地仁美, 片岡礼音, 山中宏二. U snRNP 形成における筋萎縮性側索硬化症(ALS)原因遺伝子 TDP-43 の役割. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.13-16.
18. 築地仁美, 井口洋平, 古屋亜佐子, 片岡礼音, 村山繁雄, 祖父江 元, 山中宏二. 運動神経変性疾患に共通するスプライソソーム異常. 日本 RNA 学会, 仙台, 2012.7.20.
19. 日出山 拓人, 寺本 さやか, 八賀 康介, 山下 雄也, 辻 省次, 郭 伸. 加齢が孤発性 ALS の危険因子であることの分子病態の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
20. 佐々木 彰一, 日出山 拓人, 郭 伸. コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスの電顕的検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
21. 築地仁美, 山中宏二. Spliceosome Integrity is a Common Target for Motor Neuron Disease.

- 第 35 回日本神経科学学会大会シンポジウム, 名古屋, 2012.9.21.
22. 築地仁美, 井口洋平, 古屋亜佐子, 片岡礼音, 初田裕幸, 熱田直樹, 田中章景, 橋詰良夫, 赤津博康, 村山繁雄, 祖父江元, 山中宏二. 運動神経変性疾患に共通するスプライソソーム異常. 第54回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2013.4.24-26.
 23. 石垣診祐, 藤岡祐介, 岡田洋平, 渡辺宏久, 勝野雅央, 祖父江元. FUS-PSF複合体はタウ遺伝子Maptのsplicing制御を通じてALS/FTLDの神経変性に関与する. 第54回日本神経学会学術大会. 東京, 2013.5.29-6.1.
 24. Ishigaki S, Fujioka Y, Udagawa T, Honda D, Okada Y, Katsuno M, Okado H, Sobue G. FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ in association with clinicopathological features of ALS/FTLD. Neuro2013, 京都, 2013.6.20-23.

国際会議

1. Yamanaka K, Fujimori-Tonou, N, Yamashita H. Gene Ablation of Innate Immune System Adaptor TRIF Significantly Accelerates Disease Progression of ALS Mice. American Academy of Neurology 63rd Annual Meeting, Honolulu, USA, 2011.4.14.
2. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Kwak S. Downregulation of RNA editing enzyme ADAR2 and sporadic ALS. The 22nd International Symposium on ALS/MND, Sydney, Australia, 2011.11.30-12.2.
3. Yamanaka K, Fujimori-Tonou N, Yamashita H. Elimination of innate immune system adaptor TRIF significantly accelerates disease progression of ALS mice. The 22nd International Symposium on ALS/MND, Sydney, Australia, 2011.11.30-12.2.
4. Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, Nukina N: A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. The 22th International symposium on ALS/MND, Sydney, Australia, 2011.11.30-12.2.
5. Hideyama T, Teramoto S, Yamashita T, Kwak S. Age-related association of TDP-43 mislocalisation with reduced activity of ADAR2, an RNA editing enzyme, in normal mouse motor neurons suggests a molecular basis for age-related acceleration of ALS. The 22nd Meeting of the European Neurological Society. Prague, 2012. 6.9-12.
6. Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome integrity is a common target for motor neuron disease. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor, USA, 2012.11.29.
7. Kwak S, Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S. Molecular mechanism generating TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) motor neurones. The 23rd Meeting of the European Neurological Society. Balcerona, Spain, 2013. 6. 8-11.

③ ポスター発表 (国内会議 45 件、国際会議 46 件)

国内会議

1. 木村大輔, 日出山 拓人, 鈴木岳之, 郭 伸. Neuronal death in tamoxifen-driven conditional ADAR2 knockout mice. 第82回薬理学会年会. 横浜, 2009.3.16-18
2. 和座雅浩, 田中章景, 蔣月梅, 黄 哲, 勝野雅央, 足立弘明, 山本正彦, 祖父江 元. Dynactin-1ノックダウン線虫モデル. 第50回日本神経学会総会. 仙台, 2009.5.20-22
3. 山下雄也, 日出山拓人, 郭 伸. ADAR2 コンディショナルノックアウトマウス (AKAMON) における運動神経死カスケードの解析. 第32回神経科学大会, neuro2009. 名古屋, 2009.9.16-18
4. 田中章景, 黄 哲, 勝又竜, 池中建介, 河合香里, 蔣月梅, 和座雅浩, 勝野雅央, 祖父江 元. Dynactin-1ノックダウン線虫における神経変性. 第51回日本神経学会総会. 東京, 2010.5.20-22
5. 山下博史, 藤森典子, 片岡礼音, 山中宏二. 変異SOD1発現マイクログリアにおける食食機能の評価 第51回日本神経学会総会. 東京, 2010.5.20-22
6. Watanabe S, Yamanaka K. Possibility of the impairment of ATP synthesis and

- ER-mitochondria membrane-dynamics in the cell model of neurodegenerative disease.第 27 回内藤カンファレンス(Membrane Dynamics and Lipid Biology [I]). 札幌, 2010.6.29-7.2
7. 山下博史, 藤森典子, 片岡礼音, 山中宏二. 変異SOD1発現マイクログリアにおける食食機能の評価 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010.5.20-22.
 8. Ishigaki S, Fujioka Y, Zhu J, Urano F, Sobue G. Analysis of differential gene profiles in differentiated FUS knock-down motor neurons. 第33回神経科学大会, neuro2010. 神戸, 2010.9.2-4.
 9. 山下雄也, 日出山拓人, 寺本さやか, 郭 伸. GluR2 RNA編集異常とTDP-43蛋白のプロセッシング異常の分子連関. 第33回神経科学大会, neuro2010. 神戸, 2010.9.2-4.
 10. 築地仁美, 片岡礼音, 山中宏二. 筋萎縮性側索硬化症ALSの原因遺伝子群によるRNA制御 RNAフロンティアミーティング2010, 静岡, 2010.9-27-29.
 11. 渡辺祥司, 金子貢巳, 山中宏二. ALS病因タンパク質TDP-43変異体による細胞毒性の機序 BMB2010 (第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2010.12.7-10.
 12. 日出山拓人, 山下雄也, 相澤仁志, 柿田明美, 高橋均, 辻省次, 鈴木岳史, Seeburg PH, Higuchi M, 高橋良輔, 三澤日出巳, 郭 伸. 孤発性ALSにおけるRNA編集異常のメカニズムと運動ニューロン死. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011.5.18-20.
 13. 井口洋平, 勝野雅央, 丹羽淳一, 高木伸之介, 田中章景, 祖父江 元. 酸化ストレスによるTDP-43修飾の検討. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011.5.18-20.
 14. 池中建介, 河合香里, 黄 哲, 蔣月梅, 勝又竜, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江 元. dynactin-1ノックダウンによる孤発性ALS線虫モデルの作成と病態解析. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011.5.18-20.
 15. 高木伸之介, 井口洋平, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江 元. 孤発性ALS におけるFUSの病理学的特徴. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 2011.5.18-20.
 16. 池中建介, 河合香里, 黄 哲, 蔣月梅, 和座雅浩, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江 元. 孤発性 ALS モデルとしての Dynactin1-knock down 線虫の作成. 第 2 回名古屋大学医学部・生理学研究所合同シンポジウム. 名古屋, 2011.8.20.
 17. 藤岡祐介, 石垣 診祐, 祖父江 元. 家族性 ALS 原因遺伝子 FUS/TLS ノックダウンに伴う選択的スプライシング変化-マウス脊髄前角細胞初代培養を用いた splicing-sensitive array (exonarray) による網羅的解析- 第 2 回名古屋大学医学部・生理学研究所合同シンポジウム. 名古屋, 2011.8.20.
 18. 井口洋平, 勝野雅央, 高木伸之介, 祖父江 元. Oxidative stress induces TDP-43 modification, recapitulating its pathological feature. 第 34 回日本神経科学大会. 横浜 2011.9.14-17.
 19. 池中建介, 勝野雅央, 河合香里, 黄哲, 蔣月梅, 田中章景, 祖父江 元. dynactin-1 ノックダウンによる孤発性 ALS 線虫モデルの作成と病態解析. 第 34 回日本神経科学大会. 横浜, 2011.9.14-17.
 20. 山下博史, 藤森典子, 片岡礼音, 井口洋平, 熱田直樹, 田中章景, 祖父江元, 伊東秀文, 高橋良輔, 山中宏二. 細胞特異的トランスクリプトームを用いた、孤発性ALS患者脊髄のDNAマイクロアレイによる解析. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.14-17.
 21. 渡辺祥司, 金子貢巳, 山中宏二. ALS 病因タンパク質 TDP-43 変異体は mRNA の品質管理に影響を及ぼす. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9.21-24.
 22. Ishigaki S, Fujioka Y, Okada Y, Masuda A, Ohno K, Sobue G. FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ: a novel link between FUS and Tau in the pathogenesis of ALS and FTL. The 35th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan, 2012.9.19-21.
 23. Ishigaki S, Fujioka Y, Sobue G. FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ in neurons: a novel link between FUS and Tau in the pathogenesis of ALS and FTL. 6th International Symposium of Nanomedicine, Matsue, Japan, 2012.11.29-12.1.
 24. 勝又 竜, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江 元. 筋萎縮性側索硬化症, 及びそのモデルマウ

- スの腰髄におけるリン酸化 Cofilin の評価. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
25. 井口洋平, 勝野雅央, 高木 伸之介, 田中章景, 祖父江 元. 運動ニューロン特異的 TDP-43 ノックアウトマウスの病態解析. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
26. 石垣診祐, 藤岡祐介, 田中章景, 祖父江 元. ALS における FUS/TLS の質的機能喪失と病態: FUS/TLS の核内高分子複合体の機能解析から. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
27. 河合香里, 池中建介, 勝又 竜, 井口洋平, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江 元. dynactin-1 ノックアウトによる孤発性 ALS モデルマウスの作成と病態解析. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
28. 高木 伸之介, 井口洋平, 石垣診祐, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江 元. TDP-43 の凝集体形成における RNA 結合障害の関与. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
29. 藤岡祐介, 石垣診祐, 増田章男, 大野欽司, 祖父江 元. 家族性 ALS 原因遺伝子 FUS/TLS ノックダウンに伴う選択的 splicing 変化. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
30. 澤田 潤, 相澤 仁志, 浅野目 明日香, 遠藤 寿子, 齋藤 司, 片山 隆行, 長谷部 直幸, 山下 雄也, 郭 伸. AMPA 受容体サブユニットの GluA2 の Q/R 部位 RNA 編集率に対する薬剤の効果. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.22-25.
31. 遠藤史人, 山中宏二. TGF- β 1 は ALS モデルマウスの疾患進行を加速する. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012. 5.22-25.
32. 遠藤史人, 山中宏二. Roles of TGF- β 1 in the disease progression of ALS mice. 第 35 回日本神経科学学会大会, 名古屋, 2012. 9. 19.
33. 小峯 起, 藤森典子, 山中宏二. The role of innate immunity in the disease progression of ALS. 第 35 回日本神経科学学会大会, 名古屋, 2012. 9. 19.
34. 河合香里, 池中建介, 勝野雅央, 井口洋平, 勝又竜, 田中章景, 祖父江 元. dynactin-1 ノックアウトによる孤発性 ALS モデルマウスの作成と病態解析. 第 54 回日本神経学会学術大会. 東京, 2013.5.29-6.1.
35. 藤岡祐介, 石垣診祐, 増田章男, 大野欽司, 祖父江 元. 家族性 ALS 原因遺伝子 FUS/TLS ノックダウンに伴う選択的 splicing 変化: マウス中枢神経系初代培養を用いた splicing-sensitive microarray による網羅的解析. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013.5.29-6.1.
36. 遠藤史人, 小峯 起, 山中宏二. TGF- β 1 はミクログリア、T 細胞の機能を修飾し ALS マウスの疾患進行を加速する. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013.5.29-6.1.
37. 渡邊征爾, 山中宏二. Mutant copper-zinc superoxide dismutase 1 accumulated at the mitochondria associated membrane in SOD1G93A transgenic mice model. Neuro2013, 京都, 2013.6.20-23.
38. 遠藤史人, 山中宏二. The roles of TGF- β 1 in the disease progression of ALS mice. Neuro2013, 京都, 2013.6.20-23.
39. 築地仁美, 井口洋平, 古屋亜佐子, 片岡礼音, 初田裕幸, 熱田直樹, 田中章景, 橋詰良夫, 赤津博康, 村山繁雄, 祖父江 元, 山中宏二. Spliceosome integrity is a common target for motor neuron disease. Neuro2013, 京都, 2013.6.20-23.
40. 山下博史, 藤森典子, 伊藤秀文, 井口洋平, 熱田直樹, 田中章景, 祖父江 元, 高橋良輔, 山中宏二. Microarray analysis in spinal cords of sporadic ALS patients with cell-type specific transcriptome. Neuro2013, 京都, 2013.6.20-23.
41. 小峯 起, 藤森典子, 山下博史, 森脇康博, 三澤日出巳, 山中宏二. Elimination of innate immune system adaptor TRIF significantly accelerates disease progression of ALS mice. Neuro2013, 京都, 2013.6.20-23.

42. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. Comparison of FUS-regulated transcriptome in four primary cell lineages in the central nervous system reveals cell-specific regulations in association with ALS/FTLD. Neuro2013, 京都, 2013.6.20-23.
43. 藤岡祐介, 石垣診祐, 増田章男, 大野欽司, 祖父江 元. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. 包括脳ネットワーク 夏のワークショップ, 名古屋, 2013.8.29-9.1.
44. 宇田川剛, 藤岡祐介, 本田大祐, 衣斐大祐, 永井拓, 横井聡, 勝野雅央, 岡戸晴生, 石垣診祐, 祖父江元. FUS depletion in adult causes behavioral abnormalities that mimic FTLD through post-transcriptional regulation of synaptic protein expression. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.3-6.
45. 築地仁美, 井上育代, 古屋亜佐子, 山中宏二. 神経変性疾患モデルである TDP-43 トランスジェニックマウスにおける TDP-43 の標的遺伝子の同定. 第 35 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.3-6.

国際会議

1. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S. Sporadic ALS model mice by RNA editing enzyme abnormality. The 6th Forum of European Neuroscience Forum 2008 Geneve, Switzerland, 2008.7.12-16.
2. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S. Slow death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by conditional targeting of RNA editing enzyme ADAR2. The 19th International Symposium on MND/ALS. 2008, Birmingham, 2008.11.3-5.
3. Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T, Kwak S. Regulatory mechanism of GluR2 Q/R site-editing in cultured cell lines. The 38th Annual Meeting Society for Neuroscience. Washington 2008.11.15-19.
4. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S. Slow neuronal death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by RNA editing enzyme ADAR2 knockout. The 38th Annual Meeting Society for Neuroscience. Washington 2008.11.15-19.
5. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. Neuroscience 2009. Chicago, USA 2009.10.17-21.
6. Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S. Slow death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by conditional targeting of RNA editing enzyme ADAR2. The 20th International Symposium on MND/ALS. 2009, Berlin, Germany 2009.12.8-10
7. Watanabe S, Yamanaka K. The mechanism of cleavage and cellular localization of TDP-43 as a causative protein of ALS. The 20th international symposium on ALS/MND. Berlin, Germany. 2009.12.8-10.
8. Tsuiji H, Yamanaka K. Colocalization of TDP-43, an RNA/DNA-binding Protein, and Survival of Motor Neuron in Nucleus. The 19th CDB meeting, RNA Sciences in Cell and Developmental Biology. Kobe 2010. 5.10-12.
9. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Kwak S. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. The XIIth International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples Italy, 2010.7.17-22.
10. Ishigaki S, Fujioka Y, Zhu J, Urano F, Sobue G. Analysis of differential gene profiles in FUS knock-down motor neurons. The 40th Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA. 2010.11.13-17.
11. Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Sobue G. Oxidative stress induces TDP-43 modification, recapitulating its pathological feature. The 40th Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA. 2010.11.13-17.
12. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S. Absence of GluR2 RNA editing induces slow death of motor neurons in

- conditional ADAR2 knockout mice. The 40th Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA. 2010.11.13-17.
13. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Kwak S. Close association of TDP-43 pathology with loss of RNA editing enzyme ADAR2 in motor neurons in sporadic ALS. The 21st International Symposium on MND/ALS, Orland USA. 2010.12.11-13.
 14. Tsuiji H, Kataoka A, Yamanaka K. TDP-43 in U snRNP regulation. Keystone Symposia Conference, Neurodegenerative Diseases: The Molecular and Cellular Basis for Neurodegeneration. Taos, USA, 2011.2.21-26.
 15. Tsuiji H, Kataoka A, Yamanaka K. A role of TDP-43 in the regulation of spliceosomal U snRNPs. The 16th Annual Meeting of The RNA Society. Kyoto, Japan, 2011.6.14-18.
 16. Lasiene J, Jacobson-Powers BE, Horner PJ, Yamanaka K. A possible role of neuregulin 1 in synapse maintenance in ALS. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, 2011.7.14-19.
 17. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Kwak S. Inefficient RNA editing of GluA2 with ADAR2 downregulation and sporadic ALS. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience. Firenze. 2011.7.14-19.
 18. Tsuiji H, Kataoka A, Yamanaka K. A role of TDP-43 in regulation of U snRNP formation. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings: Eukaryotic mRNA Processing. Cold Spring Harbor, New York, USA, 2011.8.23-27.
 19. Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Kwak S. Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. The 6th Brain Research conference "RNA binding proteins in neurological disease. Washington DC, USA, 2011. 11.10-11.
 20. Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Kwak S. Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. The 41st Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 2011. 11. 12-16.
 21. Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K. Familial ALS-linked TDP-43 mutations cause their protein stabilization and dysregulate mRNA metabolism. The 22nd International symposium on ALS/MND, Sydney, Australia, 2011.11.30-12.2.
 22. Sasaki S, Hideyama T, Kwak S. Ultrastructural study of spinal cord motor neurons in ADAR2-deficient mice. The 22nd International Symposium on MND/ALS, Sydney, Australia, 11. 30-12. 2, 2011.
 23. Ishigaki S, Fujioka Y, Sobue G. Quality loss of FUS function is involved in the pathogenesis of ALS. The 41st Society for Neuroscience annual meeting, Washinton DC, 2011.11.12-26.
 24. Fujioka Y, Ishigaki S, Sobue G. Profiles of differential gene expression and alternative splicing in FUS knock-down primary motor neurons. The 41st Society for Neuroscience annual meeting, Washinton DC, 2011.11.12-26.
 25. Tsuiji H, Kataoka A, Iguchi Y, Atsuta N, Tanaka F, Sobue G, Yamanaka K: TDP-43 maintains proper U snRNA levels through association with SMN in Cajal/Gem body. *Keystone Symposia on Protein-RNA interactions in Biology and Disease*, Taos, USA, 2012.3.4-9.
 26. Yamashita H, Fujimori N, Ito H, Iguchi Y, Atsuta N, Tanaka F, Sobue G, Takahashi R, Yamanaka K. Microarray Analysis in Spinal Cords of Sporadic ALS Patients with Cell-Type Specific Transcriptome. American Academy of Neurology 64th Annual Meeting, New Orleans, USA, 2012.4.25.
 27. Yamashita H, Fujimori-Tonou, N, Iguchi Y, Atsuta N, Tanaka F, Sobue G, Takahashi R, Yamanaka K. Microarray analysis in spinal cords of sporadic ALS patients with cell-type specific transcriptome. The 13th Asian Oceanian Congress of Neurology, Melbourne, Australia, 2012.6.5.
 28. Kwak S, Hideyama T, Teramoto S, Yamashita T. Molecular link between TDP-43 and reduced ADAR2 in ALS motor neurons. GRC Neurobiology of Brain Disorders, Stonehill College, Easton, USA, 2012. 8. 5-10.
 29. Ishigaki S, Fujioka Y, Masuda A, Iguchi Y, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. Comparison of Fus-regulating gene expression and alternative splicing profiles among different cell lineages in the central nervous system. The 42nd Society for Neuroscience annual meeting, New

Orleans, USA, 2012.10.13-17.

30. Komine O, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Moriwaki Y, Misawa H, Yamanaka K. Elimination of innate immune system adaptor TRIF significantly accelerates disease progression of ALS mice. Society for Neuroscience 2012, New Orleans, USA, 2012.10.14.
31. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Sobue G. Loss of TDP-43 Results In Age-dependent Progressive Motor Impairment And Neuropathological Alterations, Mimicking Motor Neuron Disease, The 23rd ALS/MND international symposium, Chicago, USA, 2012.12.4-7.
32. Hideyama T, Teramoto S, Yamashita T, Kwak S. Aging and ADAR2 activity in motor neurons. The 23rd ALS/MND international symposium, Chicago, USA, 2012.12.4-7.
33. Sasaki S, Yamashita T, Hideyama T, Kwak S. Autophagy in the spinal motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. The 23rd ALS/MND international symposium, Chicago, USA, 2012.12.4-7.
34. Yamashita H, Fujimori-Tonou, N, Ito H, Iguchi Y, Atsuta N, Tanaka F, Sobue G, Takahashi R, Yamanaka K. Microarray analysis in spinal cords of sporadic ALS patients with cell-type specific transcriptome. The 23rd international symposium on ALS/MND, Chicago, USA, 2012.12.5-7.
35. Endo F, Yamanaka K. Roles of TGF- β 1 in the disease progression of ALS mice. The 23rd international symposium on ALS/MND, Chicago, USA, 2012.12.5-7.
36. Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Sakimura K, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. The 18th annual meeting of the RNA society, Davos, Switzerland, 2013.6.11-16.
37. Kwak S. AMPA receptor-mediated activation of calpain triggers TDP-43 pathology in ALS by cleaving TDP-43 into aggregation-prone fragments. GRC Calcium signaling, Lucca, Italy, 2013. 6. 16-21.
38. Komine O, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Moriwaki Y, Misawa H, Yamanaka K. Deletion of TLR-associated signaling adaptor TRIF significantly accelerates disease progression of ALS mice. 11th European meeting on glial cells in health and disease. Berlin, Germany, 2013.7.3-6.
39. Ishigaki S, Fujioka Y, Udagawa T, Honda D, Katsuno M, and Sobue G. FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ: a novel link between FUS and Tau in the pathogenesis of ALS and FTL. RNA Metabolism in Neurological Disease, 8th Brain Research Conference. San Diego, CA, 2013.11.7-8.
40. Ishigaki S, Fujioka Y, Udagawa T, Honda D, Katsuno M, and Sobue G. FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ in association with clinicopathological features of ALS/FTLD: a novel link between FUS and Tau in the pathogenesis of ALS and FTL. The 42nd Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, CA, 2013.11.9-13.
41. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, and Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. RNA Metabolism in Neurological Disease, 8th Brain Research Conference. San Diego, CA, 2013.11.7-8.
42. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, and Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. The 42nd Society for Neuroscience annual meeting. San Diego, CA, 2013.11.9-13.
43. Tsuiji H, Inoue I, Kataoka A, Furuya A, Yamanaka K. Cell-type-specific changes in gene expression in TDP-43 transgenic mice displaying impaired memory. 8th Brain Research Conference, RNA metabolism in neurological disease, San Diego, USA, 2013.11.7-8.
44. Endo F, Komine O, Wyss-Coray T, Yamanaka K. The roles of TGF- β 1 in the disease progression of ALS mice. Society for Neuroscience 2013, San Diego, USA, 2013.11.9-13.
45. Niikura M, Tanabe S, Moriwaki Y, Yamanaka K, Misawa H. Motor neuron-derived osteopontin is an aggravation factor in the disease onset of ALS mice. Society for Neuroscience 2013, San Diego,

USA, 2013.11.9-13.

46. Watanabe S, Wakasugi K, Yamanaka K. Cystatin C protected neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity in vitro. 24th international symposium on ALS/MND, Milan, Italy, 2013.12.5-7.

(4)受賞・報道等

①受賞

池中 建介 2011年 第54回日本神経化学学会大会:大学院優秀発表賞 2011.9.28

山中 宏二 2013年 日本神経学会賞 学術研究部門 2013.5.29.

②マスコミ(新聞・TV等)報道

プレスリリース「マウスにおける筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療実験に成功ー孤発性筋萎縮性側索硬化症の根本治療へ向けた大きなステップー」2013.9.26.【概要】郭特任教授と東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 山下雄也特任研究員らの研究グループが、自治医科大学 村松慎一特命教授らと共同で、脳や脊髄のニューロンのみに ADAR2 遺伝子を発現させるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発し、このベクターを孤発性 ALS の病態を示すモデルマウスの血管に投与したところ、その運動ニューロンの変性と脱落、および症状の進行を食い止めることに世界に先駆けて成功した。

§ 5 研究期間中の活動

主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
22年6月18日	ワークショップ：筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発	日本都市センター	118人	ALS動物モデルからみえるもの、レイトブレインリサーチ(optineurin)、FUS/TLSをめぐる、をテーマに開催した。
22年8月30日	Workshop on Recent advance in motor neuron disease research オーガナイザー： 祖父江元, 山中宏二	理化学研究所脳科学総合研究センター	50人	海外ALS研究者2名およびチーム研究者3名による講演を通じて最新のALS研究を議論する公開国際ワークショップを開催した。 海外講演者 Albrecht Clement: ドイツ, Janice Robertson: カナダ
24年11月15-16日	Global COE the 4th International Symposium. "Global COE Symposium on Neuro-Tumor Biology and Medicine"	Westin Nagoya Castle Hotel, Nagoya	230人	学術交流

§ 6 最後に

我々は、孤発性 ALS の運動ニューロンで起きている変性過程を解明すべく、患者剖検脊髄から運動ニューロンを単離・解析し、変性運動ニューロンに特異的な多くの分子イベントを明らかにしてきた。このうち軸索輸送や細胞周期などにかかわる dynactin1 の発現低下やカルシウム透過性を規定するグルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集の低下と RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) type 2 (ADAR2) の活性低下は変性運動ニューロンに特異的な変化であることを明らかにして来たが、一方では孤発性 ALS の病変部で見られるユビキチン陽性封入体が TDP-43 (TAR DNA-binding protein of 43 kDa) からなることが明らかにされ、さらに TDP-43 の遺伝子変異による遺伝性 ALS の家系が報告され、TDP-43 の機能異常も孤発性 ALS の病態に深く関与していることが示唆されている。我々は、これらの分子の変化を再現する動物モデルを作成し、運動ニューロン変性の病態解明と治療法開発を目指して本研究を行った。

その結果、本研究では dynactin 1, ADAR2, TDP-43 の各々の分子の機能障害が運動ニューロン変性の原因となること、およびそれらの病的変化の間には相互作用があり、複数の経路が総合的に神経変性に至ることを明らかにすることができた。さらに、dynactin 1, ADAR2 を標的とした治療法の開発を進め、マウスでの効果の検証を行った。これらの治療法は孤発性 ALS の治療戦略として、今後更なる検証を行い、臨床応用へと進めていきたいと考えている。当初の研究目的であった、孤発性 ALS のモデル作成を通じた病態解明と治療法開発については概ね達成でき、さらに当初予定していなかった c-Abl を標的とした治療法開発や FUS の機能解析など、孤発性 ALS の病態・治療に関する極めて重要な知見を得ることができ、*Brain*, *EMBO Mol Med*, *Nat Commun* をはじめとする一流紙にこうした成果を発表することができた。このような成果は、郭・山中両チームが研究代表者のチームとの優れたチームワークにより達成されたものであり、それはいくつかの共同研究による成果として具現化されている。

本研究に参加した研究者らは ALS や神経変性疾患の研究において世界をリードする立場であり、今回の成果を今後さらに発展させることにより、神経難病の代表格である ALS の治療法開発とその臨床応用に向けて歩みを停めることなく前進していきたいと考えている。